

# **Bedeutung des ABC-Transporters MRP2/cMOAT/ABCC2 bei der Cisplatinresistenz humaner Tumorzellen**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie  
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Verena Waltraut Materna, geb. Schaub  
geboren am 7. Oktober 1973 in Bautzen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Herrmann
2. PD Dr. Hermann Lage
3. PD Dr. Wolfgang Dreier

eingereicht am: 16.08.2002

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2002

## **Zusammenfassung**

Tumorzellen können vielfältige Resistenzmechanismen gegenüber Zytostatika entwickeln. Untersuchungen an drei humanen Tumorzelllinien und ihren cisplatinresistenten Varianten zeigten eine Assoziation von erhöhter MRP2-Expression und dem Auftreten von Cisplatinresistenz. Darüberhinaus waren die cisplatinresistenten Zelllinien gegenüber Carboplatin kreuzresistent. Um weitere Faktoren im Zusammenhang mit der Cisplatinresistenz zu untersuchen, wurde der Mutationsstatus von p53 und der zelluläre Glutathiongehalt in den Zelllinien bestimmt. Der offene Leserahmen von MRP2 aus der cisplatinresistenten Ovarialkarzinomzelllinie A2780RCIS wurde für die Transfektion in die cisplatin-sensitive Zelllinie A2780 genutzt. Die Transfektanten zeigten eine Überexpression von MRP2 und wiesen eine Resistenz gegenüber Cisplatin und Carboplatin auf. Dies konnte in Zellzyklus- und Apoptose-Untersuchungen unter Cisplatinbehandlung bestätigt werden. Durch computergestützte Faltungsanalysen von Abschnitten der MRP2-mRNA wurden zwei potentielle Ribozymschnittstellen ausgewählt. Die konstruierten Anti-MRP2-Hammerhead-Ribozyme RzM1 und RzM2 wurden im zellfreien System auf ihre Schnittaktivität getestet und erwiesen sich als katalytisch aktiv. Es wurden verschiedene kinetische Parameter für RzM1 und RzM2 ermittelt und mit anderen Ribozymen verglichen. Die Ribozyme zeigten eine gute Effektivität bei der Spaltung ihres Zielmoleküls, wobei RzM1 die höhere Effektivität aufwies. Beide Ribozyme wurden auf ihre Wirksamkeit durch Transfektion in die Zelllinie A2780RCIS getestet. Die untersuchten Transfektanten zeigten eine geringere Expression von MRP2 auf mRNA- und Proteinebene und wiesen eine verminderte Resistenz gegenüber Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin und Etoposid auf. Die Ribozyme RzM1 und RzM2 waren gleichermaßen für die Expressionsregulierung von MRP2 in Tumorzellen geeignet. In Zellzyklus- und Apoptose-Untersuchungen wurde funktionell bestätigt, daß die A2780RCIS-Anti-MRP2-Ribozym-Transfektanten auf eine Cisplatinbehandlung stärker ansprechen als die cisplatinresistente Ausgangszelllinie A2780RCIS. Die Anwendung der Ribozyme RzM1 und RzM2 zur Unterstützung der Chemotherapie von Tumorzellen scheint daher vielversprechend.

Schlagworte:

MRP2, cMOAT, ABCC2, Cisplatin, Ribozym, Chemoresistenz

## **Abstract**

Tumour cells can develop a lot of resistance mechanisms against cytostatic drugs. Examinations of three human tumour cell lines and their cisplatinresistant variants showed an association of elevated MRP2 expression and the occurrence of cisplatinresistance. Moreover, the cisplatinresistant cell lines were crossresistant against carboplatin. To examine further factors in context of cisplatinresistance the mutation status of p53 and the cellular glutathione content of the cell lines were determined. The MRP2-open reading frame of the cisplatinresistant ovarian carcinoma cell line A2780RCIS was used for transfection into the cisplatininsensitive cell line A2780. The transfectants showed an overexpression of MRP2 and a resistance against cisplatin and carboplatin. This could be confirmed with analysis of the cell cycle and apoptosis induction after treatment with cisplatin. Using computer aided folding analysis of MRP2 mRNA parts two possible ribozyme cleavage sites were selected. The constructed anti-MRP2 hammerhead ribozymes RzM1 and RzM2 were tested in a cell-free system with respect to their cleavage activities and were found to be catalytic active. Various kinetic parameters of RzM1 and RzM2 were determined and compared with other ribozymes. The ribozymes showed a good effectivity for the substrate cleavage, although RzM1 had the better effectivity. Both ribozymes were tested for their effectiveness after transfection into the cell line A2780RCIS. The transfectants showed a lower MRP2 expression on mRNA and protein level and also a reduced resistance against cisplatin, carboplatin, daunorubicin, and etoposide. The ribozymes RzM1 and RzM2 were both equally suitable for the regulation of MRP2 expression in tumour cells. Analysis of cell cycle and apoptosis induction could confirm functionally the higher sensitivity of the A2780RCIS-anti-MRP2 ribozyme transfectants after treatment with cisplatin in comparison to the cisplatinresistant cell line A2780RCIS. Therefore, the application of the ribozymes RzM1 and RzM2 for the support of cancer chemotherapy seems to be promising.

## **Keywords:**

MRP2, cMOAT, ABCC2, cisplatin, ribozyme, chemoresistance

*Das Sonnenstäubchen fern im Raume,  
das Tröpfchen, das im Grase blinkt,  
das dürre Blättchen, das vom Baume  
im Hauch des Windes niedersinkt –  
Ein jedes wirkt an seinem Örtchen  
still weiter, wie es muß und mag,  
ja, selbst ein leises Flüsterwörtchen  
klingt fort bis an den Jüngsten Tag.*

*Wilhelm Busch*

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Chemotherapie	2
1.1.1	Cisplatin und Carboplatin	2
1.1.2	Daunorubicin	3
1.1.3	Etoposid	4
1.2	Mechanismen der Chemoresistenz	6
1.2.1	Überblick	6
1.2.2	Bedeutung von ABC-Transportern	8
1.2.3	Der ABC-Transporter MRP2/cMOAT/ABCC2	11
1.3	Tumorzelllinien zur Untersuchung von Resistenzmechanismen	12
1.4	Ribozyme	13
1.4.1	<i>Hammerhead</i> -Ribozyme	13
1.4.2	Ribozymdesign	15
1.4.3	Kinetische Parameter von Ribozymen	15
1.5	Zielstellungen der vorliegenden Arbeit	17

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Radiochemikalien	21
2.1.3	Enzyme (inklusive Puffer) und Inhibitoren	21
2.1.4	Nukleinsäuren	22
2.1.5	Kits, Fertiglösungen und Antikörper	25
2.1.6	Geräte	26
2.1.7	Verbrauchsmaterial	28
2.1.8	Biologisches Material	28

---

2.1.9	Computer und Software	29
2.2	Methoden	31
2.2.1	Zellkultur	31
2.2.2	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	32
2.2.3	Transfektion der Zelllinien A2780 und A2780RCIS	32
2.2.4	Kultur von Bakterien	33
2.2.5	Transformation von <i>E. coli</i>	34
2.2.6	Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	34
2.2.7	Behandlung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.2.8	Präparation von RNA	34
2.2.9	Agarosegel-Elektrophorese von RNA	35
2.2.10	Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen	36
2.2.11	Northern-Blot	36
2.2.12	Markierung von DNA-Sonden	36
2.2.13	Northern-Hybridisierung	37
2.2.14	Reverse Transkription	37
2.2.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.16	Agarosegel-Elektrophorese von DNA	40
2.2.17	Elution von DNA-Fragmenten	41
2.2.18	Ligation von DNA-Fragmenten	41
2.2.19	Sequenzierung von DNA	42
2.2.20	Identifikation potentieller Ribozym-Schnittstellen in der MRP2-mRNA	42
2.2.21	Ribozym-DNA-Matrizen für die <i>in vitro</i> -Transkription	42
2.2.22	<i>in vitro</i> -Transkription	43
2.2.23	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) von RNA	43
2.2.24	Elution und Fällung von RNA aus Polyacrylamidgelen	44
2.2.25	Bestimmung der Stoffmenge radioaktiv markierter RNA	45
2.2.26	<i>in vitro</i> -RNA-Prozessierung	46
2.2.27	Berechnung der Reaktionsparameter der ribozymatischen Spaltung	47
2.2.28	Präparation von Membranproteinen	50
2.2.29	Bestimmung von Protein-Konzentrationen	51
2.2.30	Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Proteinen	52
2.2.31	Western-Blot	53

---

2.2.32	Antikörper-Reaktion und Detektion mittels Chemolumineszenz	53
2.2.33	Proliferationsassay mittels SRB	54
2.2.34	Glutathion-Assay	55
2.2.35	Caspase-3-Assay	56
2.2.36	Zellzyklus-Analyse mittels Durchflußzytometrie	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
3.1	Charakterisierung der Zelllinien und ihrer cisplatinresistenten Varianten	58
3.1.1	Wachstumsverhalten der Zelllinien unter Zytostatikabehandlung	58
3.1.2	Mutationsstatus von <i>p53</i> in den Zelllinien	60
3.1.3	Expression von Genen mit Relevanz für Chemoresistenz in den Zelllinien	61
3.2	Überexpression von MRP2 in der Zelllinie A2780	66
3.2.1	Klonierung von MRP2 aus der Zelllinie A2780RCIS	67
3.2.2	Transfektion von MRP2 in die Ovarialkarzinomzelllinie A2780	68
3.3	Entwicklung und Applikation von Ribozymen gegen die MRP2-mRNA <i>in vitro</i>	73
3.3.1	Auswahl potentieller Ribozymschnittstellen	73
3.3.2	Ribozymatische Spaltung von Fragmenten der MRP2-mRNA durch die Ribozyme RzM1 und RzM2	75
3.3.3	Charakterisierung der Ribozyme RzM1 und RzM2 <i>in vitro</i>	76
3.4	Inhibition von MRP2 in der Zelllinie A2780RCIS durch RzM1 und RzM2	82
3.4.1	Klonierung der Ribozyme und Transfektion in die Zelllinie A2780RCIS	82
3.4.2	Resistenzverhalten in den A2780RCIS-Ribozym-Transfektanten	82
3.4.3	MRP2-Expression in den A2780RCIS-Ribozym-Transfektanten	85
3.4.4	Zellzyklus und Apoptose in den A2780RCIS-Ribozym-Transfektanten	89
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>93</b>
4.1	Resistenzuntersuchungen an humanen Tumorzelllinien	93
4.2	Expression von chemoresistenzassoziierten Genen	93
4.3	Charakterisierung von Anti-MRP2- <i>Hammerhead</i> -Ribozymen <i>in vitro</i>	96
4.4	Rolle von MRP2/cMOAT/ABCC2 bei der Cisplatinresistenz	98
4.5	Veränderungen in Zellzyklus und Apoptose nach MRP2-Modulation	102

---

4.6	Praxisrelevanz und Ausblick	103
	Literaturverzeichnis	105
	Danksagung	117
	Curriculum vitae	118
	Selbständigkeitserklärung	121



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Strukturformel von Cisplatin	2
Abb. 1.2:	Strukturformel von Carboplatin	3
Abb. 1.3:	Strukturformel von Daunorubicin	4
Abb. 1.4:	Strukturformel von Etoposid	5
Abb. 1.5:	Strukturformel von Vincristin	5
Abb. 1.6:	Chemoresistenzmechanismen	7
Abb. 1.7:	Membrantopologie von ABC-Transportern	10
Abb. 1.8:	<i>Hammerhead</i> -Struktur eines Ribozyms	14
Abb. 3.1:	Sensitivität der untersuchten Zelllinien gegenüber Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Etoposid und Vincristin	59
Abb. 3.2:	mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR in den untersuchten Zelllinien	62
Abb. 3.3:	Expression der MRP2-mRNA in den untersuchten Zelllinien	63
Abb. 3.4:	MRP2-Protein-Expression in den untersuchten Zelllinien	65
Abb. 3.5:	Glutathion-Gehalt in den untersuchten Zelllinien	66
Abb. 3.6:	Amplifikation des ORFs von MRP2 mittels RT-PCR aus A2780RCIS	67
Abb. 3.7:	Sensitivität der A2780-MRP2-Klone gegenüber Cisplatin	69
Abb. 3.8:	Zellzyklusanalysen in den A2780-MRP2-Klonen	71
Abb. 3.9:	Caspase-3-Aktivität nach Cisplatinbehandlung in den MRP2-Klonen.	72
Abb. 3.10:	Sekundärstruktur von einem Ausschnitt der MRP2-mRNA	74
Abb. 3.11:	Sequenzen der Anti-MRP2- <i>Hammerhead</i> -Ribozyme RzM1 und RzM2	74
Abb. 3.12:	Spaltung der Substrate sub1 und sub2 durch die <i>Hammerhead</i> -Ribozyme RzM1 und RzM2	75
Abb. 3.13:	Zeitabhängigkeit der Spaltung durch RzM1 und RzM2	77
Abb. 3.14:	Produkt-Zeit-Diagramm zur Bestimmung der Initialgeschwindigkeit $v_{ini}$	78
Abb. 3.15:	Abhängigkeit der Spaltung von der Konzentration der Ribozyme	79
Abb. 3.16:	Bestimmung des Parameters $k_{cat}/k_M$	80
Abb. 3.17:	Bestimmung des Parameters $k_{obs}$	81
Abb. 3.18:	Sensitivität der A2780RCIS-RzM-Klone gegenüber Cisplatin	83
Abb. 3.19:	Insertkontrolle mittels RT-PCR der Transfektanten A2780RCIS-RzM2	86
Abb. 3.20:	Expression der MRP2-mRNA in den A2780RCIS-RzM-Klonen	87
Abb. 3.21:	Expression von MRP2 in den A2780RCIS-RzM2-Klonen	89

Abb. 3.22: Zellzyklusanalysen in den A2780RCIS-RzM-Klonen	90
Abb. 3.23: Caspase-3-Aktivität nach Cisplatinbehandlung in den Anti-MRP2-Ribozym-Klonen	92

### Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.	22
Tab. 2.2: Humane Karzinomzelllinien.	29
Tab. 2.3: Primer-Hybridisierungstemperaturen ( $T_H$ ) der durchgeführten PCRs.	38
Tab. 2.4: Reaktionsbedingungen bei der RNA-Prozessierung.	47
Tab. 3.1: $IC_{50}$ -Werte für Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Vincristin und Etoposid der untersuchten Zelllinien.	60
Tab. 3.2: TP53-Status in den untersuchten Zelllinien.	61
Tab. 3.3: <i>Real-time</i> -RT-PCR zur Quantifizierung der MRP2-Expression in den Zelllinien.	64
Tab. 3.4: $IC_{50}$ -Werte für Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Vincristin und Etoposid der A2780-MRP2-Klone.	69
Tab. 3.5: <i>Real-time</i> -RT-PCR zur Quantifizierung der MRP2-Expression in den A2780-MRP2-Klonen.	70
Tab. 3.6: $IC_{50}$ -Werte für Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Vincristin und Etoposid der A2780RCIS-RzM-Klone.	84
Tab. 3.7: <i>Real-time</i> -RT-PCR zur Quantifizierung der MRP2-Expression in den A2780RCIS-RzM-Klonen.	88
Tab. 4.1: Katalytische Parameter verschiedener <i>Hammerhead</i> -Ribozyme.	98

---

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Bindungskassette ( <i>ATP-binding cassette</i> )
<i>A. bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCRP	Brustkrebs-Resistenzprotein ( <i>breast cancer resistance protein</i> )
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Seralbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> )
CH	Schweiz
Ci	Curie
cMOAT	kanalförmiger multispezifischer organischer Anionentransporter ( <i>canalicular multispecific organic anion transporter</i> )
cpm	Zählimpulse je Minute ( <i>counts per minute</i> )
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
D	Deutschland
DEPC	Diethylpyrokarbonit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	Desoxyribonukleotid(e)
DTT	DL-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
FKS	fötales Kälberserum
G1/G2-Phase	<i>gap</i> -Phasen des Zellzyklus ( <i>gap</i> = Lücke)
G418	Geneticin-Sulfat

---

GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
$\gamma$ -GCS	$\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
IC <sub>50</sub>	halbmaximale wachstumsinhibitorische Konzentration
J	Japan
Kap.	Kapitel
k <sub>cat</sub>	katalytische Konstante
k <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
k <sub>obs</sub>	Konstante für den beobachteten Stoffumsatz
LB	Luria-Bertani
LRP	<i>lung resistance-related</i> Protein
LV	Leervektor
MDR	Multidrug-Resistenz
MMR	<i>mismatch</i> -Reparatur
MOPS	3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ( <i>m</i> = <i>messenger</i> )
MRP	MDR-assoziiertes Protein
MTT	Methylthiazoltetrazolium
mut	mutiert
NCI	National Cancer Institute
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nt	Nukleotide
NTP(s)	Nukleotid-5'-Triphosphate
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = x$
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
ox.	oxidierte Form
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffer saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PM	Plasmamembran
POD	Peroxidase

---

red.	reduzierte Form
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
RzM	Anti-MRP2-Ribozym
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
S-Phase	Synthese-Phase
SRB	Sulforhodamin B
SSC	Natriumchlorid-Natriumzitat ( <i>sodium chloride-sodium citrate</i> )
sub	Substrat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenprozessierung
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>H</sub>	Hybridisierungstemperatur
TP	Tumorsuppressor-Protein
TM	transmembrane Domäne
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur (m = <i>melting</i> )
T <sub>Meß</sub>	Meßtemperatur
U	Einheit ( <i>unit</i> )
UK	<i>United Kingdom</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UMP	Uracil-5'-Monophosphat
UTP	Uracil-5'-Triphosphat
UV	ultraviolett
v <sub>ini</sub>	Initialgeschwindigkeit
vs.	gegen ( <i>versus</i> )
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent

---

## 1 Einleitung

In Deutschland erkranken jährlich schätzungsweise 350 000 Menschen neu an Krebs. Nach den Herz-Kreislauferkrankungen ist Krebs in der westlichen Welt die zweithäufigste Todesursache. Da sich die Bevölkerungsstruktur immer mehr in Richtung zu Menschen mit höherem Lebensalter verschiebt und das Krebsrisiko mit dem Alter zunimmt, wird in etwa 15 Jahren Krebs die Haupttodesursache sein (Becker und Wahrendorf, 1998).

25 bis 30 % aller Krebstodesfälle gehen auf das Rauchen zurück. Epidemiologische Untersuchungen der letzten Jahre weisen darauf hin, daß die Ernährungsgewohnheiten mit 20 bis 42 % an einer Krebsentstehung beteiligt sind (Willet, 1995). Weitere wichtige Risikofaktoren sind virale Infektionen, bestimmte genetische Prädispositionen, erhöhter Alkoholkonsum, sowie Expositionen mit bestimmten chemischen Stoffen oder Strahlungen, wie z. B. ionisierende und UV-Strahlung (Harvard Report on Cancer Prevention, 1996; Becker und Wahrendorf, 1998).

Tumorerkrankungen werden durch die Kombination von chirurgischer Entfernung, Radiotherapie, Chemotherapie und in einigen Fällen auch Hyperthermie behandelt. Die Heilungserfolge sind jedoch in Abhängigkeit von der Tumorart sehr unterschiedlich. Unter der Behandlung (Selektionsdruck) entwickeln sich sehr häufig Resistenzen, die dazu führen, daß sich die Tumore nach und nach der Wirkung dieser Therapieformen entziehen. Um Krebserkrankungen möglichst erfolgreich therapieren zu können, müssen die verursachenden genetischen Veränderungen bzw. die den Resistenzen zugrunde liegenden Mechanismen erkannt und in die Diagnostik miteinbezogen werden.

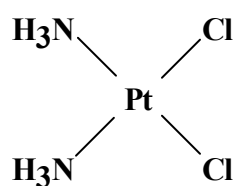
Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Suche nach einem generellen Mechanismus für Cisplatinresistenz anhand des Vergleichs von Modellzelllinien. Der Zusammenhang eines solchen Mechanismus mit der Chemoresistenz soll funktionell belegt und näher untersucht werden. Außerdem soll versucht werden, aus den Ergebnissen Ansatzpunkte für die Diagnostik und Therapie von malignen Tumoren abzuleiten.

## 1.1 Chemotherapie

Neben der operativen Entfernung und der Radiotherapie gehört die medikamentöse Behandlung trotz weiterer denkbarer Ansätze zu den heute am häufigsten verwendeten Therapien. Dabei werden strukturell verschiedenste natürliche, synthetische und halbsynthetische Substanzen eingesetzt, die auf sich teilende Zellen zytotoxisch oder zytostatisch wirken. Diese Stoffe werden unter dem Begriff Zytostatika oder Chemotherapeutika zusammengefaßt. Nach ihrem Wirkmechanismus werden diese Substanzen u. a. in DNA-alkylierende Agentien, Antimetabolite, Mitosehemmstoffe, Antibiotika, Enzyme und Hormone eingeteilt. Im Folgenden sollen die Zytostatika vorgestellt werden, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

### 1.1.1 Cisplatin und Carboplatin

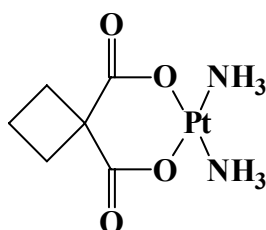
Die zytostatische Wirkung von Cisplatin (cis-Diamindichloroplatin (II)) wurde durch Versuche mit Bakterien entdeckt (Rosenberg *et al.*, 1965). In diesen Experimenten wurde beobachtet, daß sich *E. coli* im elektrischen Feld zwischen zwei Platinelektroden nicht mehr zu teilen vermag und nur noch durch Größenzunahme wachsen kann. In den folgenden Jahren wurde festgestellt, daß diese Wirkung auf Cisplatin (Abb. 1.1) zurückzuführen ist, das sich in der Lösung gebildet hatte. Heute ist Cisplatin eines der meist genutzten Zytostatika und wird u. a. bei der Behandlung von Ovarial- und Bronchialkarzinomen eingesetzt (Manetta *et al.*, 1998; Oguri *et al.*, 1999; Young *et al.*, 1999). Seine Wirkung beruht hauptsächlich auf der Bildung von kovalenten Addukten von Cisplatin mit den Basen in der DNA, wodurch sich DNA-Inter- und -Intrastrang-Quervernetzungen bilden. Am häufigsten treten 1,2-d(GpG)- und 1,2-d(ApG)-Intrastrang-, sowie 1,3-d(GpNpG)-Interstrang-Addukte auf. Diese Addukte, die außerdem die DNA in ihrer Konformation verändern, behindern die Replikation und Transkription und führen im Folgenden zur Apoptose (Trimmer und Essigmann, 1999).



**Abb. 1.1: Strukturformel von Cisplatin**

Für die zytostatische Wirkung werden auch Wechselwirkungen mit der RNA und DNA-Protein-Quervernetzungen diskutiert, die aber eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen (Übersicht in Zeller und zur Hausen, 1995).

Das ebenfalls als Zytostatikum eingesetzte Carboplatin (cis-Diamin(1,1-Cyclobutandicarboxylato)platin (II)) zeigt einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Cisplatin. Carboplatin reagiert (Abb. 1.2) wesentlich weniger und langsamer mit der DNA im Vergleich zu Cisplatin und muß in einer 20- bis 40-fach höheren Konzentration eingesetzt werden, um die gleiche Wirkung zu erreichen. Der Vorteil dieses Zytostatikums in der klinischen Praxis bezieht sich auf die geringeren auftretenden Nebenwirkungen und die daraus resultierende bessere Verträglichkeit (Übersicht in Zeller und zur Hausen, 1995).



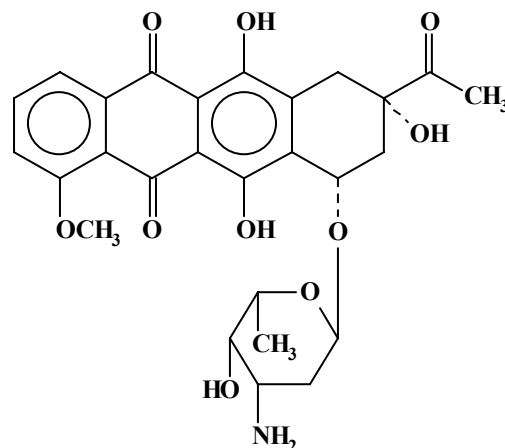
**Abb. 1.2: Strukturformel von Carboplatin**

### 1.1.2 Daunorubicin

Eine italienische und eine französische Arbeitsgruppe entdeckten ein Zytostatikum aus dem Mikroorganismus *Streptomyces peuceticus* und nannten diese Verbindung „daunomycina“ bzw. „rubidomycine“, woraus sich der heute gebräuchliche Name Daunorubicin zusammensetzt (Di Marco *et al.*, 1963; Dubost *et al.*, 1963). Es handelt sich hierbei um ein Anthrazyklin, bestehend aus dem tetrazyklischen Chromophor Daunomycinon und dem Aminozyucker Daunosamin (Abb. 1.3). Es wird hauptsächlich bei akuten Leukämien eingesetzt und wirkt am stärksten bei exponentiell wachsenden Zellen, vorwiegend in der S- und G2-Phase des Zellzyklus (Pratt *et al.*, 1994). Die Wirkmechanismen sind bis heute nicht vollständig verstanden, jedoch scheint die nichtkovalente Bindung (Interkalation) an die DNA ein wesentlicher Mechanismus für die Zytotoxizität zu sein, worauf im Folgenden DNA- und RNA-Polymerasen behindert werden. Durch Ein- oder Zwei-Elektronenreduktion bilden sich aus Daunorubicin reaktive Verbindungen, die Proteine, Lipide und DNA alkylieren können. Als weitere Mechanismen werden u. a. die Hemmung von Topoisomerasen, Helikasen, sowie



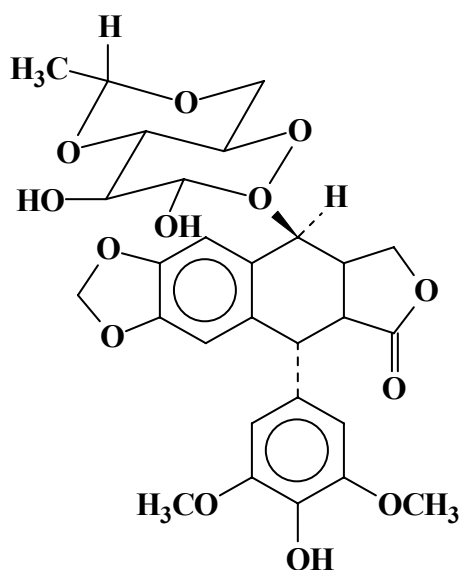
der Metallothionein-Synthese und der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung angesehen. Außerdem wird die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Induktion von Apoptose über den Sphingolipid-Metabolismus diskutiert (Übersichten in Zeller und zur Hausen, 1995; Senchenkov *et al.*, 2001).



**Abb. 1.3: Strukturformel von Daunorubicin**

### 1.1.3 Etoposid

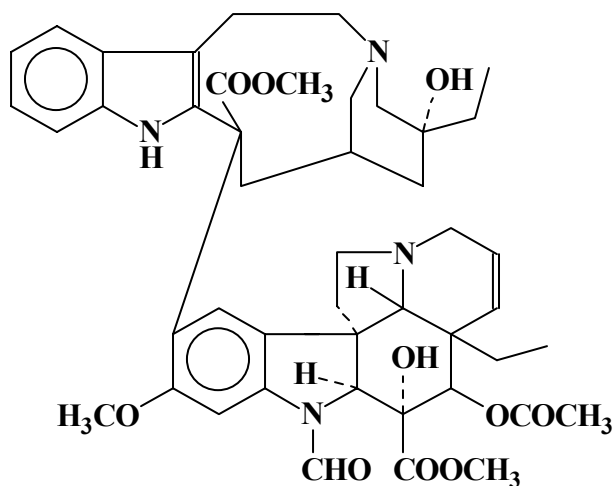
Etoposid (4'-Demethyl-epipodophyllotoxin-9-(4,6-O-2-ethyliden-β-D-glukopyranosid, Abb. 1.4) ist ein halbsynthetisches Derivat des Podophyllotoxins aus *Podophyllum peltatum* (Maiapfel). Es wird gewöhnlich in Kombination mit anderen Zytostatika z. B. bei der Behandlung des Hoden- und Ovarialkarzinoms eingesetzt (Williams *et al.*, 1987; Zanetta *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 1998). Etoposid wirkt zellzyklusphasenspezifisch und arretiert den Zellzyklus in der späten S- und frühen G2-Phase. Es wirkt dabei über die Hemmung der Topoisomerase II und scheint in dieser Funktion nicht an die DNA zu binden (Ross *et al.*, 1984). Die Topoisomerase II führt Doppelstrangbrüche in die DNA ein, um sie entwinden zu können. An diesem Prozeß des Entwindens sind weitere Proteine beteiligt, die den sogenannten „cleavable complex“ bilden. Etoposid scheint diesen Komplex zu stabilisieren, was zu persistierenden DNA-Doppelstrangbrüchen führt. Da proliferierende Zellen einen höheren DNA-Topoisomerase II-Spiegel besitzen, sind diese Zellen empfindlicher für Epipodophyllotoxine. Durch den Metabolismus von Etoposid in der Zelle entstehen auch Derivate, die alkylierend wirken können. Die gebildeten Chinone können außerdem zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führen (Übersicht in Zeller und zur Hausen, 1995).



**Abb. 1.4: Strukturformel von Etoposid**

### 1.1.4 Vincristin

Vincristin (Abb. 1.5) gehört zu den Vinca-Alkaloiden aus *Catharanthus roseus* syn. *Vinca rosea* (Madagaskar-Immergrün). Es wird in der Kombinationstherapie z. B. zur Behandlung des Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzt (Heim *et al.*, 1987).



**Abb. 1.5: Strukturformel von Vincristin**

Die Vinca-Alkaloide sind sogenannte Spindelgifte, d. h. sie hemmen durch Bindung an Tubulin die Bildung der Mikrotubuli, die als Bestandteil des Zytoskeletts bei der Mitose, der Zellbewegung und beim intrazellulären Transport mitwirken. In der Zelle gibt es ein Gleichgewicht von polymerisiertem (mikrotubulärem) und gelösten Tubulin. Durch die

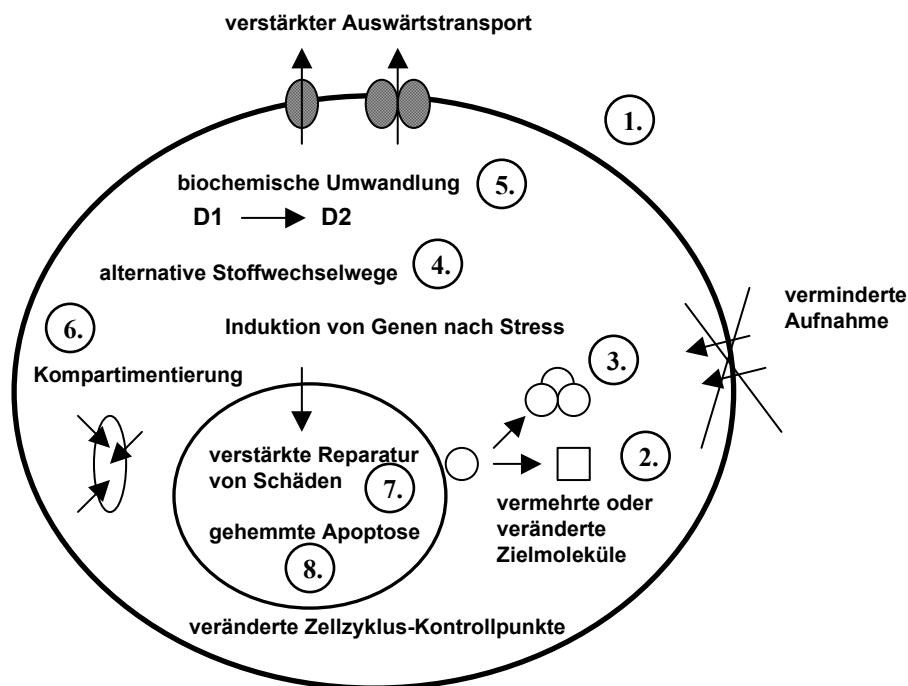
Vinca-Alkaloide kommt es zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten der gelösten Form. Aufgrund der fehlenden Mitosespindel arretieren proliferierende Zellen in der Metaphase und sterben im weiteren Verlauf ab (Übersicht in Zeller und zur Hausen, 1995).

## **1.2 Mechanismen der Chemoresistenz**

### **1.2.1 Überblick**

Unter Chemoresistenz versteht man die verminderte Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber einem Zytostatikum im Vergleich zu einer anderen Zelle. Rund die Hälfte aller malignen Tumore spricht nicht auf eine zytostatische Therapie an. Man bezeichnet dies als primäre oder intrinsische Resistenz. Ein gutes Drittel der zunächst ansprechenden Tumore entwickelt im Laufe der medikamentösen Therapie eine sogenannte sekundäre Chemoresistenz. Diese Tumore lassen sich oftmals auch nicht durch andere, noch nicht angewendete Chemotherapeutika behandeln. Dieses Phänomen nennt man pleiotrope oder Multidrug-Resistenz (MDR). In diesen Tumoren haben sich Zellen in ihrem Wachstum durchgesetzt, die bestimmte Mechanismen entwickelt haben, um sich dem Zytostatikum oder dessen Auswirkungen zu entziehen. In diesem Abschnitt sollen einige dieser Mechanismen näher vorgestellt werden (Übersichten in Lage, 1999; Kaufmann und Earnshaw, 2000; Gottesman, 2002). Prinzipiell kann man dabei die folgenden Möglichkeiten unterscheiden (Abb. 1.6):

1. verminderte Aufnahme bzw. verstärkter Auswärtstransport des Zytostatikums;
2. verändertes Zielmolekül, so daß das Zytostatikum nicht mehr binden kann;
3. vermehrtes Zielmolekül, um Funktion aufrecht zu erhalten;
4. Übernahme der Stoffwechselfunktion des Zielmoleküls durch einen alternativen Mechanismus (Tolerierung des Schadens);
5. biochemische Modifikation (Entgiftung) des Chemotherapeutikums;
6. räumliche Trennung des Zytostatikums vom Wirkort (Kompartimentierung);
7. verstärkte Reparatur der auftretenden Schäden;
8. Verhinderung des Zelltods durch Beeinflussung der Zellzyklus-Kontrolle und der Apoptose-Wege.



**Abb. 1.6: Chemoresistenzmechanismen**

In dieser Darstellung sind verschiedene Möglichkeiten der Resistenzentwicklung kultivierter Krebszellen zusammengefasst (verändert nach Gottesman, 2002). Nähere Angaben siehe Text.

Ein häufig genutzter Resistenzmechanismus ist der Auswärtstransport der zytostatischen Substanzen, bei dem die Gruppe der ABC-Transporter eine wichtige Rolle spielt. Diese Proteine werden in den Kap. 1.2.2 und Kap. 1.2.3 ausführlich vorgestellt.

Das Strukturprotein LRP (*lung resistance-related protein*) ist Hauptbestandteil eines Ribonukleoprotein-Komplexes, welcher in der Nähe der Kernporen lokalisiert ist. Da die LRP-Expression eine gewisse Assoziation mit Zytostatikaresistenz in Modellzelllinien und Tumoren zeigt, wird eine Beteiligung am Kern-Zytoplasma-Transport bzw. am Transport über Vesikel diskutiert (Chugani *et al.*, 1993; Izquierdo *et al.*, 1996). LRP könnte somit an einem Multikomponenten-Resistenzmechanismus für Kompartimentierung und Exozytose beteiligt sein (Lage, 1999).

DNA-Topoisomerasen bewirken durch die von ihnen vermittelten DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche die Entwindung der DNA, welches für die Replikation und Transkription benötigt wird. Einige Zytostatika inhibieren den Komplex mit der von ihnen bereits gespaltenen DNA und verhindern die Ligationsreaktion. Mutationen in den Topoisomerasen, die eine verminderte Affinität des Zytostatikums für sein Zielmolekül bewirken, können hier

eine Resistenz vermitteln. Eine verminderte Expression oder Aktivität der Topoisomerasen führen ebenfalls dazu, daß weniger DNA-Brüche im Genom akkumulieren (Übersicht in Hande, 1998; Lage, 1999; Rodriguez-Galindo *et al.*, 2000).

Viele Zytostatika schädigen die sich teilende Zelle durch Wechselwirkungen mit der DNA (Beispiele unter Kap. 1.1.1 bis 1.1.3). Deshalb spielen Veränderungen in den Reparaturmechanismen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Zytostatikaresistenzen. Durch Alkylierung auftretende Schäden können z. B. durch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase direkt behoben werden. Andere Schäden – wie z. B. Cisplatin-DNA-Addukte – werden großräumiger durch das NER-System (NER = *nucleotide excision repair*) repariert (Übersicht in Crul *et al.*, 1997). Im Zusammenhang mit Chemoresistenz wurde auch eine verminderte Expression der Gene des MMR-Systems (MMR = *mismatch repair*) in resistenten Tumorzellen beschrieben (Übersicht in Lage und Dietel, 1999). Möglicherweise führt die verringerte Expression über die im Folgenden gestörte Verbindung zum Zellzyklus und den Apoptosewegen zu einem Überleben der geschädigten Zelle (Hawn *et al.*, 1995).

Viele der am Apoptose-Prozeß beteiligten Faktoren wurden in zytostatikaresistenten Zellen als verändert exprimiert beschrieben (Übersicht in Kaufmann und Earnshaw, 2000). Ob in einer Zelle Apoptose ausgelöst wird oder nicht, hängt davon ab, wie stark die Zelle geschädigt ist bzw. ob diese Schäden von Kontrollmechanismen wahrgenommen werden. Das Tumorsuppressorgen *p53* spielt bei diesen Prozessen eine zentrale Rolle. Je nach Ausmaß der Schädigung löst TP53 als Transkriptionsfaktor oder durch direkte Wechselwirkung Reparaturprozesse oder Apoptose aus. Aus einer Vielzahl von Untersuchungen ist bekannt, daß TP53 in Tumoren häufig mutiert auftritt, wodurch die Funktion des Proteins teilweise oder komplett verloren gehen kann (Übersicht in Camplejohn und Rutherford, 2001).

### 1.2.2 Bedeutung von ABC-Transportern

In den siebziger Jahren wurde das MDR1-Gen (MDR = *multidrug resistance*) beschrieben, welches für das sogenannte P-Glykoprotein (P=Permeabilität) kodiert (Juliano und Ling, 1976). Das 170 kDa große Protein befindet sich in der Plasmamembran und ist für die Multidrug-Resistenz im klassischen Sinne zuständig. Es gehört zur Familie der ABC-Transporter, die sich durch das Vorhandensein von membrandurchspannenden Domänen und

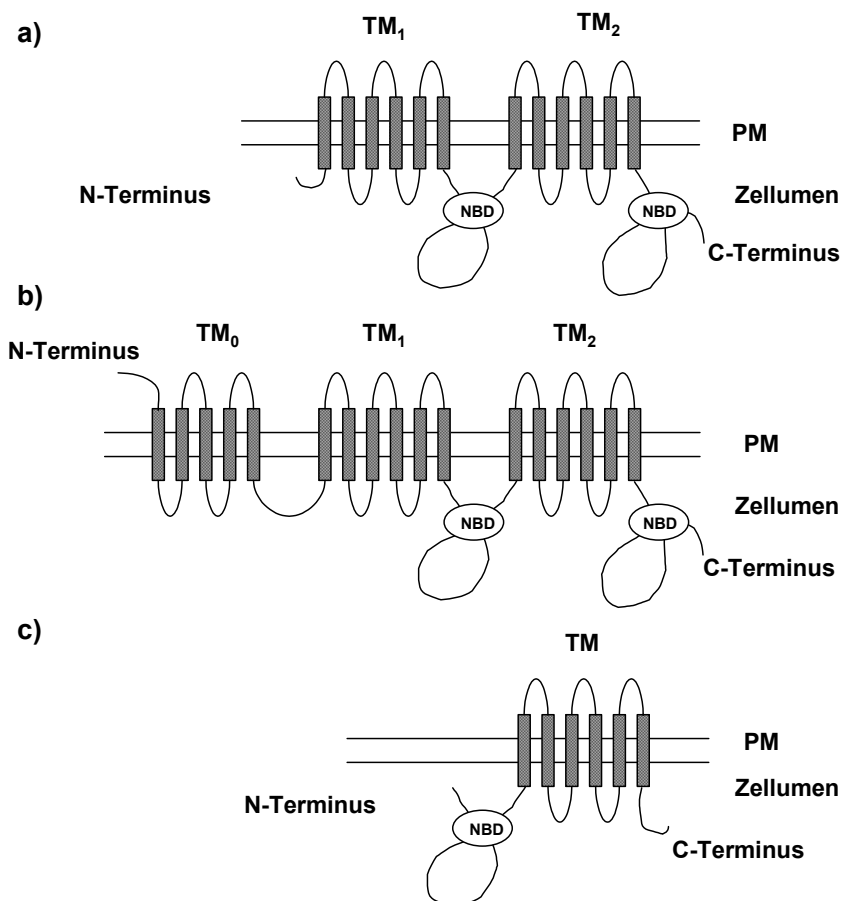
ATP-Bindungsdomänen (ABC = *ATP-binding cassette*) auszeichnen. Die Energie für den Transport strukturell sehr verschiedener Substanzen über diese ABC-Transportproteine wird durch die Bindung und Hydrolyse von ATP gewonnen. P-Glykoprotein kann u. a. den Transport von Anthrazyklinen, Anthrazenen, Vinca-Alkaloiden, Epipodophyllotoxinen und tubulinpolymerisierenden Zytostatika vermitteln (Übersicht in Litman *et al.*, 2001).

In den frühen neunziger Jahren wurde ein weiterer, für Chemoresistenz wichtiger ABC-Transporter beschrieben (Cole *et al.*, 1992), der sich durch ein etwas anderes Kreuzresistenzmuster unterschied. Es handelte sich hierbei um das MRP (*MDR-associated protein*), welches ebenfalls Anthrazykline, Epipodophyllotoxine und Vinca-Alkaloide transportieren kann, jedoch nicht die Spindelgifte Colchicin und Taxol. Die transportierten Substanzen sind in diesem Kontext keine „Substrate“, da sie vom Transporter nicht biochemisch umgewandelt werden. Young und Holland (1999) prägten daher den Begriff Allocrite für den Transport unveränderter Verbindungen. Die Allocrite des 190 kDa großen, ubiquitär in der Plasmamembran exprimierten Proteins werden hauptsächlich als Konjugate mit Glutathion, Glukuronsäure oder als Sulfate transportiert. In diesem Zusammenhang können auch Alterationen im Glutathionstoffwechsel, wie z. B. Überexpressionen der Glutathion-S-Transferasen, bedeutsam werden, die die Übertragung des Tripeptids Glutathion auf Zytostatika katalysieren können. Dabei kann die Konjugation selbst schon einen Entgiftungsmechanismus darstellen (Übersicht in Keppler, 1999; Strange *et al.*, 2000). In den folgenden Jahren wurden weitere Mitglieder der MRP-Familie entdeckt, die nach Abschluß des humanen Genomprojekts 10 Mitglieder umfaßt, von denen aber nur 6 bisher näher charakterisiert wurden (Übersichten in Dean *et al.*, 2001; Efferth, 2001; Gottesman, 2002).

Im Zusammenhang mit Chemoresistenz sind neben den bisher genannten ABC-Transportern sogenannte Halbtransporter beschrieben worden. Diese besitzen im Gegensatz zu den Volltransportern mit zwei ATP-Bindungs- und mindestens zwei Transmembrandomänen nur jeweils eine davon (Abb. 1.7) und bilden für den Transport Homo-oder Heterodimere. Beispiele hierfür sind die Proteine TAP1 und TAP2 (TAP = *transporter associated with antigen processing*), die außer ihrer Funktion bei der Antigenpräsentation auch durch ihr Zusammenwirken beim Transport eine Resistnzerhöhung gegenüber Mitoxantron vermitteln können (Lage *et al.*, 2001). Ende der neunziger Jahre wurde der Halbtransporter BCRP beschrieben (BCRP = *breast cancer resistance protein*), welcher Resistenz gegenüber

Mitoxantron und Topotecan vermitteln kann (Doyle *et al.*, 1998). Bei diesem Transporter ist bis heute nicht geklärt, ob er als Homo- oder Heterodimer fungiert.

Mitglieder der ABC-Transportfamilie findet man sowohl in Pro- und Eukaryoten. Für den Menschen wurden bisher 48 Voll- und Halbtransporter beschrieben. Da für viele dieser Transporter mehrere alternative Namen benutzt werden, wurde in den letzten Jahren der Versuch unternommen, eine einheitliche Nomenklatur zu entwerfen. Dazu wurden die Transporter in 7 Gruppen eingeteilt (Subfamilie A bis G), wobei sie nach ihren Ähnlichkeiten in der Sequenz gruppiert wurden (<http://www.med.rug.nl/mdl/humanabc.htm> und <http://www.ucl.ac.uk>).



**Abb. 1.7: Membrantopologie von ABC-Transportern**

Dargestellt sind verschiedene Typen von ABC-Transportern in der Plasmamembran (PM). a) mit zwei Transmembrandomänen (TM<sub>1</sub> und TM<sub>2</sub>) und zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD), z. B. MDR1; b) mit drei Transmembrandomänen (TM<sub>0</sub>, TM<sub>1</sub> und TM<sub>2</sub>) und zwei NBDs, z. B. MRP1 und MRP2; c) mit je einer NBD und Transmembrandomäne (TM), z. B. BCRP. Jede der transmembranen Domänen besteht aus 6 membrandurchspannenden Helices (verändert nach Gottesman, 2002)

### 1.2.3 Der ABC-Transporter MRP2/cMOAT/ABCC2

Der ABC-Transporter MRP2, auch cMOAT (*canalicular multispecific organic anion transporter*) genannt, gehört zur MRP-Familie. Er wurde als zweites Mitglied dieser Familie von Membrantransportern identifiziert und erhielt daher die Bezeichnung MRP2. Nach der neuen Nomenklatur (Kap. 1.2.2) wurde er zur ABC-Transporter-Subfamilie C, der CFTR/MRP-ähnlichen Proteine, mit der Bezeichnung ABCC2 zugeordnet. Das humane Homolog wurde aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu seinem aus der Ratte verwandten Gen kloniert (Taniguchi *et al.*, 1996; Büchler *et al.*, 1996). Das Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert und liefert eine mRNA von ca. 5 kb Länge. Die genomische Struktur von MRP2 besteht aus 32 Exons, deren Größe zwischen 56 und 255 bp liegt (Toh *et al.*, 1999; Tsuji *et al.*, 1999). Der Promotor von MRP2 enthält u. a. Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP1, AP2, TBP und C/EBP $\beta$ , wobei die beiden letztgenannten Bedeutung für die basale Expression von MRP2 besitzen (Tanaka *et al.*, 1999; Stöckel *et al.*, 2000). Das human Protein besteht aus 1545 Aminosäuren und wird hauptsächlich in der apikalen Membran von Hepatozyten exprimiert. Eine geringere Expression wurde auch für die Niere und den Dünndarm beschrieben (Kool *et al.*, 1997). MRP2 besteht aus drei transmembranen und zwei nukleotidbindenen Domänen (Abb. 1.7) und besitzt damit eine Transmembrandomäne (am N-Terminus) mehr als das P-Glykoprotein. Durch Mutationsanalyse wurde festgestellt, daß der C-Terminus des Proteins besonders wichtig für die Lokalisation in der apikalen Membran und somit für die Ausscheidungsfunktion dieses Proteins ist (Harris *et al.*, 2001).

Die biologische Funktion dieses Transporters besteht in der Ausscheidung von Bilirubin, das bei dem Abbau des Hämoglobins entsteht. In diesem Zusammenhang wurde auch das humane Krankheitsbild bei defektem oder fehlendem MRP2 beschrieben. Es handelt sich hierbei um das Dubin-Johnson-Syndrom, bei dem sich dunkel pigmentierte Ablagerungen in der Leber bilden und erhöhte Bilirubin-Spiegel im Blut gemessen werden. Da die Patienten im allgemeinen keine Beeinträchtigungen aufweisen, wird diese Krankheit nur sehr selten diagnostiziert (Übersicht in Zimniak, 1993). Einige Patienten wurden bereits auf Mutationen in MRP2 untersucht, wobei sowohl Punktmutationen als auch Deletionen gefunden wurden (Kamisako *et al.*, 2000; Mor-Cohen *et al.*, 2001).



Nach Beschreibung des Gens wurden Expressionsuntersuchungen in Tumorzelllinien durchgeführt. Bei Vergleich der Expressionshöhe mit der Sensitivität gegenüber bestimmten Zytostatika zeigte sich eine besondere Assoziation mit der Resistenz gegenüber Cisplatin (Taniguchi *et al.*, 1996; Kool *et al.*, 1997; Minemura *et al.*, 1999). Häufig wurden auch Resistenzen gegenüber Anthrazyklinen, Vincristin, Etoposid und Camptothecin gefunden, wobei es je nach Zellsystem Unterschiede in diesem Kreuzresistenzmuster gab (Koike *et al.*, 1997; Keppler *et al.*, 1999). Der funktionelle Zusammenhang mit der Resistenzentwicklung konnte durch Transfektionsexperimente nach Klonierung der vollständigen cDNA-Sequenz von MRP2 bestätigt werden (Kawabe *et al.*, 1999).

Für pharmakologische Untersuchungen haben sich zwei Tiermodelle der Ratte durchgesetzt, welche durch Mutation in MRP2 transportdefizient sind (Paulusma *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1997). Das Spektrum der transportierten Konjugate ist ähnlich dem von MRP (Kap. 1.2.2), jedoch mit unterschiedlichen Spezifitäten für einzelne Substanzen. So transportiert MRP1 17 $\beta$ -Glukuronosyl-Östradiol bevorzugt vor Monoglukuronosyl-Bilirubin, wohingegen sich die Präferenzen bei MRP2 umkehren (Übersicht in Keppler *et al.*, 1997). In jüngerer Zeit ist man dazu übergegangen, die MRP2-Expression in Tumorpatienten zu untersuchen (Nies *et al.*, 2001; Soini *et al.*, 2001). Jedoch ist die Bedeutung der MRP2-Expression im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie bzw. dem Überleben der Tumorpatienten noch nicht ausreichend verstanden. Desweiteren wurden genetische Polymorphismen für MRP2 beschrieben (Itoda *et al.*, 2002), deren mögliche Auswirkungen auf die Funktion des Proteins noch nicht untersucht worden sind.

### **1.3 Tumorzelllinien zur Untersuchung von Resistenzmechanismen**

Häufig benutzt man zur Aufklärung von Resistenzmechanismen Zelllinienmodelle, von denen die resistenten Varianten aus der parentalen Linie durch eine allmähliche Konzentrationserhöhung eines gewählten Zytostatikums herangezogen wurden. Das Ausmaß der Resistenz (Resistenzfaktoren) kann man mit Hilfe verschiedenster Methoden bestimmen. Man unterscheidet dabei zwischen Klonogenitätsassay und Proliferationsassay. Zu den am häufigsten benutzten Proliferationsassays gehören der Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay) und der MTT-Test, wobei der auf einer Proteinbestimmung basierende SRB-Assay am besten mit der Zellzahl korreliert (Perez *et al.*, 1993).

In dieser Arbeit wurden humane Tumorzelllinien aus drei verschiedenen Geweben verwendet. Die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 wurde aus einer noch nicht mit Zytostatika behandelten Patientin gewonnen (Eva *et al.*, 1982). Die Melanomzelllinie wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms isoliert (Fogh *et al.*, 1978) und am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, USA) etabliert. Ausgehend von dieser chemosensitiven Zelllinie wurde die cisplatinresistente Variante MewoRCIS selektioniert (Kern *et al.*, 1997). Die Nebennierenrindenkarzinomzelllinie D43/86 wurde 1986 von einem männlichen Patienten im Universitätsklinikum Eppendorf (Hamburg, D) etabliert (nicht publiziert). Durch schrittweises Erhöhen der Cisplatinkonzentration im Zellkulturmedium wurden zu den Zelllinien A2780 und D43/86 cisplatinresistente Varianten selektioniert (nicht publiziert) und als A2780RCIS und D43/86RCIS bezeichnet.

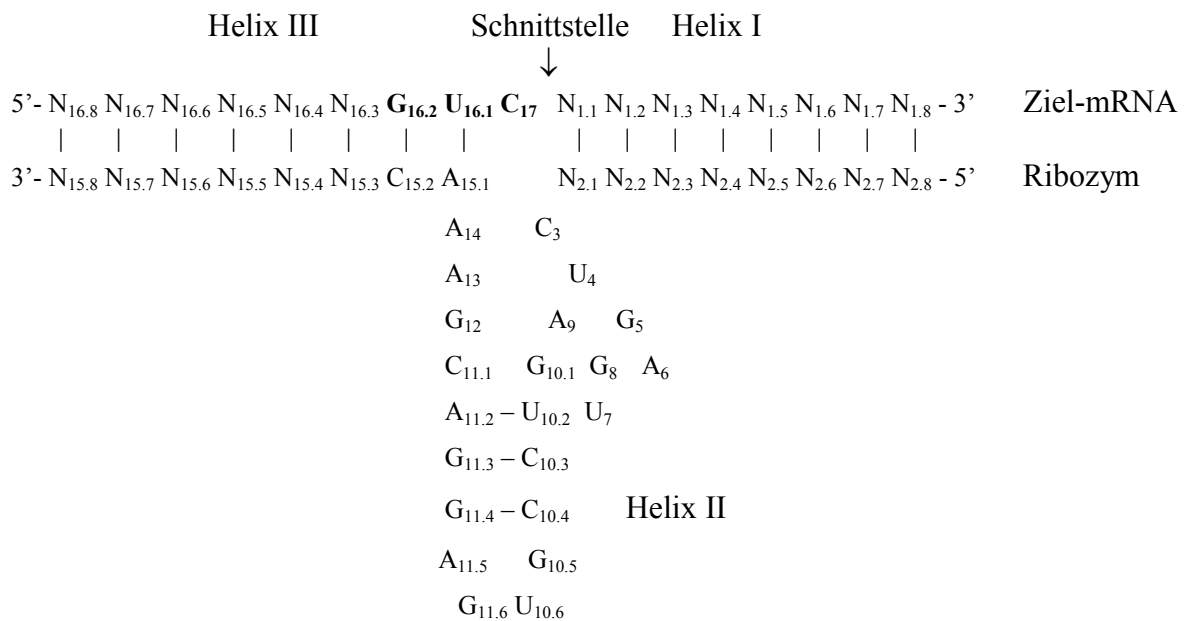
## 1.4 Ribozyme

Ribozyme sind katalytisch aktive, einzelsträngige RNA-Oligonukleotide, die als *Antisense*-Moleküle an ihr Zielmolekül binden und dieses endoribonukleolytisch spalten. Im Anschluß an diese Reaktion löst es sich von seinem Substrat und bindet an das nächste Zielmolekül. Diese Eigenschaft ist ein großer Vorteil gegenüber *Antisense*-Oligonukleotiden, die lediglich ein Zielmolekül binden und so inhibieren können. Gemäß dieser Definition gehören RNase P, Gruppe I- und II-Introns, das Spliceosom, das *Hammerhead*-Ribozym und das *Hairpin*-Ribozym in diese Gruppe (Übersicht in Lewin und Hauswirth, 2001). Natürlich vorkommende Ribozyme wurden außerdem im Hepatitis Delta-Virus und in *Neurospora* gefunden. Darüber hinaus wurden sogenannte DNA-Enzyme beschrieben, die in der Lage sind, RNA-Moleküle sequenzspezifisch zu spalten (Sen und Geyer, 1998).

### 1.4.1 *Hammerhead*-Ribozyme

Die *Hammerhead*-Ribozyme erhielten ihren Namen aufgrund der Tatsache, daß die zweidimensionale Struktur dieser Ribozyme an den Kopf eines Hammerhais erinnert (Abb. 1.8). Nach der Beschreibung der katalytischen Aktivität dieser kleinen RNA-Moleküle (Forster und Symons, 1987), wurden intensive Studien zur sekundären und tertiären Struktur durchgeführt. Dabei beschrieb man den Aufbau mit drei Stammstrukturen (Helix I, II und III), die den katalytischen Kern flankieren, und ermittelte hochkonservierte Einzelstrangbereiche

innerhalb der Hammerkopf-Struktur. Das Substrat muß die Sequenz 5'-NUX-3' enthalten, wobei „N“ für jedes Nukleosid, „U“ für Uridin und „X“ für Adenosin, Cytidin oder Uridin steht. Die beste Spalteffizienz wurde für das 5'-GUC-3'-Triplett beschrieben (Haselhoff und Gerlach, 1988). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich 5'-GUC-3'-Triplets als potentielle Schnittstellen in Betracht gezogen.



**Abb. 1.8: Hammerhead-Struktur eines Ribozyms**

Dargestellt sind die Sekundärstruktur und die gebräuchliche Nomenklatur (Hertel *et al.*, 1992) für *Hammerhead*-Ribozyme, sowie die Bindung an ein Substrat (verändert nach Lyngstadaas, 2001). Die Nukleotide C<sub>3</sub> bis C<sub>15.2</sub> sind konserviert. Mutationen in diesem Bereich führen zu Aktivitätsverlust bei der ribozymvermittelten Spaltung. Helix I besteht aus den Nukleotiden mit den Nummern 1 und 2, Helix II aus den Nukleotiden Nummer 10 und 11 und Helix III aus den Nukleotiden mit den Nummern 15 und 16. Die Ribozymschnittstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

*Hammerhead*-Ribozyme wurden in den vergangenen Jahren häufig benutzt, um die Expression von Genen in Zusammenhang mit der Tumorigenese und der Chemoresistenzentwicklung zu modulieren (Übersicht in Bettinger und Read, 2001). So wurden u. a. Ribozyme gegen *mdr1* (Holm *et al.*, 1994 und 1995), GPC3 (Wichert *et al.*, 1999), LRP (Kitazono *et al.*, 1999), *K-ras* (Funato *et al.*, 2000), BCRP (Kowalski *et al.*, 2001 und 2002) und  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (Iida *et al.*, 2001) entwickelt und ihre Wirksamkeit erprobt.

### 1.4.2 Ribozymdesign

Ribozyme katalysieren die sequenzspezifische Spaltung mittels alkalischer Hydrolyse in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen. Diese Reaktion ist somit abhängig vom pH-Wert, der Temperatur und der  $Mg^{2+}$ -Konzentration (Dahm und Uhlenbeck, 1991). Um die *in vitro*-Versuche weitgehend den Bedingungen in der Zelle anzupassen, wurden die Reaktionsbedingungen wie folgt gewählt:  $c(Mg^{2+}) = 12 \text{ mM}$ ,  $pH = 7,5$  und  $T = 37 \text{ °C}$  (Kap. 2.2.26). Die ideale Länge der hybridisierenden Arme des *Hammerhead*-Ribozyms liegt bei 6 bis 8 Nukleotiden, was durch experimentelle Erprobung festgestellt werden konnte (Lieber und Strauss, 1995).

In den letzten Jahren ist man dazu übergegangen, durch computergestützte Faltungsmethoden, die Sekundärstruktur einer gegebenen Ziel-mRNA zu berechnen. Man kann die Lage bestimmter schneidbarer Triplets nach unterschiedlichen Kriterien beurteilen und eine Vorauswahl treffen. Die Faltungsprogramme bieten im Allgemeinen mehrere Strukturvorschläge an, die sich in der freien Energie  $\Delta G$  unterscheiden (z. B. mFOLD, <http://bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/rna/form1.cgi>). Man wählt solche Triplets, die an sogenannten „Schleifenstrukturen“ liegen (Stein und Cheng, 1993) bzw. Stellen, an denen die mRNA sterisch stark beansprucht wird. Die Hybridisierungssequenz der Ribozymarme muß nicht notwendigerweise an Einzelstrangbereichen der Ziel-mRNA liegen, da Ribozyme auch Tripel-Helix-Strukturen ausbilden können (Pieken *et al.*, 1991). Diese Modelle bieten jedoch nur Ansatzpunkte. In jedem Fall ist das Ribozym im zellfreien System oder unter Nutzung von Zelllinienmodellen auf seine Schnittaktivität zu testen.

### 1.4.3 Kinetische Parameter von Ribozymen

Die ribozymkatalysierte Spaltung einer spezifischen mRNA erfolgt in drei Schritten:

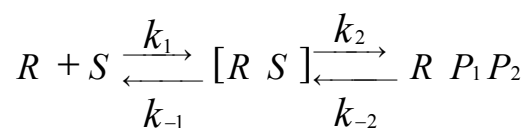
1. Assoziation von Substrat und Ribozym;
2. Substratspaltung unter Stabilisierung des Übergangszustandes und
3. Destabilisierung und Dissoziation des Ribozym von seinen Schnittprodukten.

Die Bestimmung von Reaktionsparametern kann unter *single turnover*- oder *multiple turnover*-Bedingungen erfolgen. Bei *single turnover*-Bedingungen kann jedes Ribozym maximal nur einmal schneiden (Ribozymüberschuß). Hier spielt die Dissoziation des

Ribozyms von seinem geschnittenen Substrat keine Rolle, so daß sich die Berechnung der Reaktionsparameter vereinfacht. Diese Bedingungen werden häufig für die Bestimmung von Reaktionsparametern konstruierter *Hammerhead*-Ribozyme verwendet (Wichert *et al.*, 1999; Kowalski *et al.*, 2001; Materna *et al.*, 2001). Bei *multiple turnover*-Bedingungen schneidet das Ribozym unter Substratüberschuß; jedes Ribozym kann also mehrere Substratmoleküle schneiden.

Die Initialgeschwindigkeit  $v_{\text{ini}}$  der ribozymkatalysierten RNA-Spaltung beschreibt die Geschwindigkeit des Umsatzes von ungespaltem RNA-Substrat S in die Spaltprodukte P. Sie wird aus dem Quotienten der Stoffmenge des Produkts  $n(P_t)$  zum Zeitpunkt t errechnet (Hendry *et al.*, 1997; Kap. 2.2.27). Die experimentelle Bestimmung des Parameters erfolgt aus dem Produkt-Zeit-Diagramm unter Nutzung des Anstiegs im annähernd linearen Anfangsbereich des Graphen. Im Laufe der Reaktion stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein, bei dem sich das Substrat-Produkt-Verhältnis nicht mehr weiter verändert.

Der Reaktionsparameter  $k_{\text{cat}}/k_M$  ist eine Reaktionskonstante 2. Ordnung und stellt die energetische Barriere dar, die zwischen dem Ausgangs- und dem höchsten Energieniveau der Reaktion liegt. Es handelt sich dabei um den Quotienten aus der Rate des chemischen Stoffumsatzes  $k_{\text{cat}}$  (in  $\text{s}^{-1}$ ) und der Michaelis-Konstante  $k_M$  (in M). Bei einer Reaktion in zwei Schritten nach dem Muster



wobei R das Ribozym, S das Substrat und P die Spaltprodukte darstellen, entspricht  $k_{\text{cat}}$  der Konstanten  $k_2$  und  $k_M$  dem Quotienten  $(k_{-1} + k_2)/k_1$ . Die Assoziationskonstante  $k_1$  ist bei langen Substraten, z. B. mRNAs, aufgrund von Sekundärstrukturen deutlich geringer als für Oligonukleotide (Hertel *et al.*, 1994). Aus diesem Grund sollte die Bestimmung der Reaktionskonstanten mit möglichst langen Substraten durchgeführt werden, um eine bessere Vorhersage für die Wirksamkeit des Ribozyms in der Zelle zu erreichen. Der Reaktionsparameter  $k_{\text{obs}}$  ist eine Reaktionskonstante 1. Ordnung und beschreibt den beobachteten Stoffumsatz der gesamten Reaktion und setzt sich aus der Summe der Dissoziationskonstante  $k_{-1}$  und der Konstante für die Spaltreaktion  $k_2$  zusammen.

Experimentell werden die Reaktionsparameter  $k_{\text{cat}}/k_M$  (nach Heidenreich und Eckstein, 1992 und Hendry *et al.*, 1995) und  $k_{\text{obs}}$  (nach Heidenreich *et al.*, 1994 und Hendry *et al.*, 1995) aus Kinetiken in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bzw. von der Zeit gewonnen (Kap. 2.2.27). Die Reaktionsparameter  $k_{\text{cat}}/k_M$  und  $k_{\text{obs}}$  nach Hendry *et al.* (1995) unterscheiden sich dadurch, daß für deren Bestimmung nur das tatsächlich maximal abgebaute Substrat betrachtet wurde. In der Konsequenz sind diese  $k_{\text{cat}}/k_M$ - und  $k_{\text{obs}}$ -Werte höher als die entsprechenden Werte ohne Berücksichtigung des Gleichgewichtszustandes (Wichert *et al.*, 1999; Kowalski *et al.*, 2001).

### 1.5 Zielstellungen der vorliegenden Arbeit

Um einen generellen Mechanismus für die Cisplatinresistenz in Tumorzellen zu finden, stehen die Ovarialkarzinomzelllinie A2780, die Nebennierenrindenzellkarzinomzelllinie D43/86, die Melanomzelllinie Mewo und ihre jeweiligen cisplatinresistenten Varianten zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Modellzelllinien sind folgende Fragen zu beantworten:

1. Wie hoch ist die Resistenz der cisplatinresistenten im Vergleich zu ihren parental Zelllinien?
2. Wie ist das Kreuzresistenzmuster in diesen Zelllinien?
3. Wie unterscheiden sich die cisplatinresistenten von den parental Zelllinien in der Expression bekannter Gene, die eine Bedeutung für die Chemoresistenz haben könnten?
4. Welche weiteren Faktoren könnten an der Chemoresistenz in diesen Zelllinienmodellen beteiligt sein?
5. Gibt es in den Zelllinien einen gemeinsamen Unterschied in der Genexpression?
6. Ist es möglich, mit Hilfe computergestützter Methoden und *in vitro*-Analysen, geeignete Ribozyme zu konstruieren, die die Expression des betreffenden Gens modulieren können?
7. Wie effektiv sind diese Ribozyme im Vergleich zu anderen Ribozymen?
8. Kann durch Überexpression/Ribozymeinsatz die Expression dieses Gens in Tumorzellen beeinflußt werden?
9. Wie verändert sich dadurch das Resistenzniveau gegenüber Cisplatin und weiterer ausgewählter Zytostatika?

- 
10. Wie verändern sich die Zellen nach Modulation der Expression hinsichtlich ihres Verhaltens unter Cisplatinbehandlung?
  11. Welche Möglichkeiten ergeben sich aus den Ergebnissen für die Therapie von malignen Tumoren?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden mit dem Reinigungsgrad „zur Analyse“ erworben.

Azeton	Merck (Darmstadt, D)
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Quantum (Heidelberg, D)
Agarose Ultra Pure <sup>TM</sup>	GibcoBRL (Eggenstein, D)
Amidoschwarz ( <i>naphthol blue black</i> )	Sigma (Steinheim, D)
Ammoniumazetat	Merck (Darmstadt, D)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt, D)
Ampicillin-Natriumsalz	Bristol-Myers (Heidelberg, D)
Bacto <sup>®</sup> Agar	Difco (Heidelberg, D)
Bacto <sup>®</sup> Trypton	Difco (Heidelberg, D)
Bacto <sup>®</sup> Hefeextrakt	Difco (Heidelberg, D)
Betain	Sigma (Steinheim, D)
Borsäure	Merck (Darmstadt, D)
Bovines Serumalbumin, Fraktion V (BSA)	Serva (Heidelberg, D)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal)	Promega (Mannheim, D)
Bromphenolblau	Sigma (Steinheim, D)
Carbenicillin-di-Natriumsalz	Serva (Heidelberg, D)
Carboplatin	Bristol-Myers (Heidelberg, D)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)
Cisplatin	Gry-Pharm (Kirchzarten, D)
Daunorubicin	Pharmacia (Erlangen, D)
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Serva (Heidelberg, D)
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)
Dimethyldichlorosilan-Lösung (2%) in Oktamethyl-zyklotetrasiloxan (Repel Silane ES plus one)	Pharmacia (Erlangen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Steinheim, D)



---

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck (Darmstadt, D)
5,5'-Dithionbis-(2-nitrobenzoe)-säure	Sigma (Steinheim, D)
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Steinheim, D)
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	Merck (Darmstadt, D)
Essigsäure	J. T. Baker (Griesheim, D)
Ethanol	J. T. Baker (Griesheim, D)
Ether	Sigma (Steinheim, D)
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	GibcoBRL (Eggenstein, D)
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	Serva (Heidelberg, D)
Etoposid	Bristol-Myers (Heidelberg, D)
Fetuin	Sigma (Steinheim, D)
Formaldehyd (37 %)	J. T. Baker (Griesheim, D)
Formamid	Merck (Darmstadt, D)
G418-Sulfat	Calbiochem-Novabiochem (Schwalbach, D)
D-(+)-Glukose-Lösung (45 %)	Sigma (Steinheim, D)
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG (Berlin, D)
Glutathion, oxidierte Form, freie Säure, ca. 98 %, Ethanol-frei, lyophilisiertes Pulver	Sigma (Steinheim, D)
Glutathion, reduzierte Form, freie Säure, mind. 98 %	Sigma (Steinheim, D)
Glyzin	Serva (Heidelberg, D)
Glykogen	Roche (Mannheim, D)
Glyzerin (pflanzlich)	Serva (Heidelberg, D)
Harnstoff	Merck (Darmstadt, D)
Insulin (40 IE/ml), Insuman <sup>®</sup> Rapid	Hoechst Marion Roussel (München-Martinsried, D)
Isopropanol (2-Propanol)	J. T. Baker (Griesheim, D)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)
Magermilchpulver ( <i>skim milk</i> )	Difco (Heidelberg, D)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, D)
MEM-Vitamine, 100 x in Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Biochrom AG (Berlin, D)

---

Methanol	J. T. Baker (Griesheim, D)
3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumazetat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumborhydrid	Sigma (Steinheim, D)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydrogenkarbonat (7,5 % w/v)	Biochrom KG (Berlin, D)
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck (Darmstadt, D)
Propidiumiodid (mindestens 95 %)	Sigma (Steinheim, D)
Salzsäure (32 %)	Merck (Darmstadt, D)
Sulforhodamin B (SRB) (85 %)	Sigma (Steinheim, D)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma (Steinheim, D)
Transferrin	Roche (Mannheim, D)
Trasyol <sup>®</sup> (Wirkstoff: Aprotinin)	Bayer AG (Leverkusen, D)
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt, D)
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Merck (Darmstadt, D)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-Base)	Merck (Darmstadt, D)
tri-Natriumzitratsdihydrat	Merck (Darmstadt, D)
TritonX-100	Sigma (Steinheim, D)
Tween <sup>®</sup> 20	Serva (Heidelberg, D)
Vincristin	Gry-Pharm (Kirchzarten, D)

### 2.1.2 Radiochemikalien

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP (3000 Ci/mmol)	ICN Biochemicals (Eschwege, D)
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ] UTP (800 Ci/mmol)	ICN Biochemicals (Eschwege, D)

### 2.1.3 Enzyme (inklusive Puffer) und Inhibitoren

Advantage <sup>®</sup> cDNA Polymerase Mix	Clontech (Heidelberg, D)
Ampli <sup>Taq</sup> Gold <sup>™</sup> , DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	Perkin Elmer (Rodgau-Jüdesheim, D)

---

One-Phor-All Buffer PLUS, 10 x	Pharmacia (Erlangen, D)
Proteinase K (600 U/ml)	QIAGEN (Hilden, D)
Restriktionsendonukleasen:	
<i>EcoRI</i> (10 U/μl)	Roche (Mannheim, D)
<i>KpnI</i> (10 U/μl)	Roche (Mannheim, D)
<i>XbaI</i> (10 U/μl)	Roche (Mannheim, D)
Restriktionspuffer, 10 x, L und H	Roche (Mannheim, D)
RNase, DNase-frei (500 μg/ml)	Roche (Mannheim, D)
RNaseOUT™ (RNase-Inhibitor, 40 U/μl)	GibcoBRL (Eggenstein, D)
T4 DNA-Ligase (6 U/μl), FPLCpure®	Pharmacia (Erlangen, D)
T7 RNA-Polymerase (50 U/μl)	New England Biolabs (Frankfurt/Main, D)

#### 2.1.4 Nukleinsäuren

ATP (100 mM, pH7,5)	Pharmacia (Erlangen, D)
<u>DNA-Längenstandards:</u>	
100 bp DNA-Längenstandard, 1 μg/μl	GibcoBRL (Eggenstein, D)
GeneRuler™, 1kb DNA Leiter, 0,5 μg/μl	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, D)
dNTP-Set (100 mM)	Roche (Mannheim, D)
NTP-Set (100 mM)	Roche (Mannheim, D)
Oligonukleotide (Tab. 2.1)	MWG (Ebersberg, D)
RNA-Längenstandard 0,24-9,5 kb (1 μg/μl)	GibcoBRL (Eggenstein, D)

**Tab. 2.1: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.**

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C) <sup>a</sup>
1-MOAT-rev	5'-ACC ATC ACC CCA ACA CCT GC-3'	61,4
2-MOAT-fw	5'-TTT CCA ACT GTG CTT CAA GCT G-3'	58,4
3-MOAT-rev	5'-TGA CCC CCA CTA AGA TTT ATA CCC-3'	61,0

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C) <sup>a</sup>
4-MOAT-fw	5'-CAT CAC CAT CAA GGG CAC CAC-3'	61,8
5-MOAT-rev	5'-ATC CGG CCT GTG GGT GTT G-3'	61,0
6-MOAT-fw	5'-TGC TTG GAC CAG TGA CTC TAA AAT C-3'	61,3
7-MOAT-rev	5'-ACA CCA ATC TTC TCC ATG CTA CC-3'	60,6
8-MOAT-fw	5'-TGA GCG AAT AAC TGA GTA CAC AAA AG-3'	60,1
9-MOAT-fw	5'-ATG CTG GAG AAG TTC TGC-3'	53,7
10-MOAT-fw	5'-TGA AGA GAT GAA AAC CAA GAC-3'	54,0
11-MOAT-rev	5'-CTG CTA GAA TTT TGT GCT GT-3'	53,2
12-MOAT-fw	5'-TAA TCT AGC CTA CTC CTG CCT GTT C-3'	63,0
13-MOAT-fw	5'-AAA TAA TCC ATC ATC CAT AGC-3'	52,0
MOAT-14	5'-AAT AGG GAC AGG AAC CAG G-3'	56,7
cMOAT-a1	5'-GGA ACA ATT GTA GAG AAA GGA TC-3'	57,1
cMOAT-b1	5'-CAC AAA CGC AAG GAT GAT GAA GAA-3'	59,3
G3PDH-a1	5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3'	64,8
G3PDH-b1	5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'	67,8
GAPDH-fw	5'-CAC CGT CAA GGC TGA GAA C-3'	58,8
GAPDH-rev	5'-ACC ACT GAC ACG TTG GCA G-3'	58,8
Pgp-fw	5'-GCC CTT GGA ATT ATT TCT TT-3'	51,2
Pgp-rev	5'-TGG GTG AAG GAA AAT GTA AT-3'	51,2
PMS2-fw	5'-CAG TCA GCG TGC AGC AGT TAT TTT CC-3'	64,8
PMS2-rev	5'-ACT CCT TCC AAC TCC ATG CGT GCA-3'	64,4
hMLH1-fw	5'-GGT TCA TTC ACA GCT CTG TAG-3'	57,9
hMLH1-rev	5'-CAC AGC GTT TAG TAC CCT CA-3'	57,3
MSH2-fw	5'-GAA GAT ACC ACT GGC TCT CAG TCT CTG-3'	66,5
MSH2-rev	5'-GCA CTT ATT AAT GTT GAC TGC ATC TTC TTT-3'	61,3
LRP-a3	5'-GGA TGT CAA GAC CGG AAA GGT GCG-3'	66,1
LRP-b3	5'-CCA GCT GAG AGG GAC AAC ACT GTG AAC-3'	68,0
BCRP-fw	5'-GTT TAT CCG TGG TGT GTC TGG-3'	59,8
BCRP-rev	5'-CTG AGC TAT AGA GGC CTG GG-3'	61,4
RibcMA-fw	5'-CTG CTG TGG CTG ATG AGT CCG TGA GGA CGA AAC ATA GGC T-3'	>75

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C) <sup>a</sup>
RibcMA-rev	5'-CTA GAG CCT ATG TTT CGT CCT CAC GGA CTC ATC AGC CAC AGC AGG TAC-3'	>75
PMRibcMA-fw	5'-CTG CTG TGG CTG ATG AGT CCG TGA GGA CGA CAC ATA GGC T-3'	>75
PMRibcMA-rev	5'-CTA GAG CCT ATG TGT CGT CCT CAC GGA CTC ATC AGC CAC AGC AGG TAC-3'	>75
RibcMB-fw	5'-CGA ATC CAG CTG ATG AGT CCG TGA GGA CGA AAC TGC TGT T-3'	74,6
RibcMB-rev	5'-CTA GAA CAG CAG TTT CGT CCT CAC GGA CTC ATC AGC TGG ATT CGG TAC-3'	>75
PMRibcMB-fw	5'-CGA ATC CAG CTG ATG AGT CCG TGA GGA CGA CAC TGC TGT T-3'	>75
PMRibcMB-rev	5'-CTA GAA CAG CAG TGT CGT CCT CAC GGA CTC ATC AGC TGG ATT CGG TAC-3'	>75
M13(-20)-fw	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'	51,8
M13-rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'	50,4
vector-fw	5'-CTG CTT ACT GGC TTA TCG AAA T-3'	56,5
vector-rev	5'-GAG GGG CAA ACA ACA GAT G-3'	56,7
T7MOAT-fw3	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CCT GTC GGC TCT GGG AAA TCC TC-3'	73,5
MOAT-rev2	5'-GCA CAG GCC TCC AGT ACT TG-3'	58,6
MOAT-rev3	5'-CCT CCA GGC AGC ATT TCC AAG TCT-3'	68,2
RcMAT7-fw	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG TGC TGT GGC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACA TAG GC-3'	77,5
RcMAT7-rev	5'-GCC TAT GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG CCA CAG CAC TAT AGT GAG TCG TAT TA-3'	77,5
RcMBT7-fw	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA TCC AGC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACT GCT GT-3'	76,7
RcMBT7-rev	5'-ACA GCA GTT TCG TCC TCA CGG ACT CAT CAG CTG GAT TCC TAT AGT GAG TCG TAT TA-3'	76,7
TP53-fw	5'-ATG GAG GAG CCG CAG TCA G-3'	61,0

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> (°C) <sup>a</sup>
TP53-rev	5'-TCA GTC TGA GTC AGG CCC TTC TG-3'	64,2
MRP-a	5'-AGA ACC TCA GTG TCG GGC AGC G-3'	68,8
MRP-b	5'-TCG CAT CTC TGT CTC TCC TGG G-3'	64,5

<sup>a</sup>Angaben des Herstellers laut Synthese-Report (MWG, Ebersberg, D)

### 2.1.5 Kits, Fertiglösungen und Antikörper

Blue/Orange 6x Loading Dye	Promega (Mannheim, D)
Caspase 3 Activity Assay (96 Tests)	Roche (Mannheim, D)
Color Marker (Leiter für Proteingele)	Sigma (Steinheim, D)
complete (Protease-Inhibitoren-Cocktail-Tabletten)	Roche (Mannheim, D)
DMRIE-C Reagent	GibcoBRL (Eggenstein, D)
ECL-Kit <sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Eukaryotic TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit (pcDNA3.1/V5/His-TOPO)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
ExpressHyb <sup>TM</sup> Hybridization Solution	Clontech (Heidelberg, D)
Fötales Kälberserum (FKS)	GibcoBRL (Eggenstein, D)
Leibovitz L-15 Medium	Bio Whittaker (Verviers, Belgien)
LightCycler- FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche (Mannheim, D)
Monoklonaler AK Anti-Aktin, Klon C4	Chemicon (Hofheim, D)
Monoklonaler AK cMOAT/MRP2, Klon M <sub>2</sub> I-4	Sanbio (Beutelsbach, D)
Megaprime <sup>TM</sup> DNA Labelling System	Amersham (Braunschweig, D)
One Shot <sup>TM</sup> Reagent (TOP10F <sup>+</sup> )	Invitrogen (Carlsbad, USA)
OPTI-MEM I	GibcoBRL (Eggenstein, D)
Peroxidase-konjugierter Kaninchen Anti-Maus Antikörper, IgG (H+L)	Dianova (Hamburg, D)
QIAprep Spin Plasmid Kit	QIAGEN (Hilden, D)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden, D)
SOC-Medium	Invitrogen (Carlsbad, USA)
SuperScript <sup>TM</sup> Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis	GibcoBRL (Eggenstein, D)

---

TOPO TA Cloning® Kit (pCR®2.1 TOPO)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Trizol®-Reagenz	GibcoBRL (Eggenstein, D)
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG (Berlin, D)

### 2.1.6 Geräte

Autoklav, Technoclav 50	Tecnomara (Fernwald-Steinbach, D)
Brutschrank B6120	Heraeus (Hanau, D)
Densitometer GS-670	BioRad (Richmond, USA)
FACScan	BD (Heidelberg, D)
Feinwaage MC1, Laboratory LC6200S	Sartorius (Göttingen, D)
Filmentwickler Hyperprocessor	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)

#### Fotodokumentation:

- Digital Printer UP-D860E Gel Print 2000i	Sony (Tokyo, J)
- UV-Transilluminator	MWG-Biotech (Ebersberg, D)

#### Gelelektrophoresekammern:

- Mini-Sub Cell GT, Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad (Richmond, USA)
- PA-Gelelektrophoreseapparatur Modell S4S	OWL SS (Portsmouth, USA)
Heizblock TCR 100	Roth (Karlsruhe, D)
Homogenisatoren Glas-Col®	Faust-Laborbedarf (Schaffhausen, CH)
Hybridisierungsöfen OV1	Biometra (Göttingen, D)
Inkubator BBD6220	Heraeus (Hanau, D)
Kühlfalle Vapor Trap	BioRad (Richmond, USA)
LightCycler	Roche (Mannheim, D)
Magnetrührer RCT Basic	Ika Labortechnik (Staufen, D)

#### Netzgeräte:

Power Pac 300	BioRad (Richmond, USA)
Constant Power Supply EC PS 3000/150	Pharmacia (Erlangen, D)
PCR-Gerät DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer (Rodgau-Jüdesheim, D)
PCR-Gerät TRIO-Thermoblock™	Biometra (Göttingen, D)

inklusive TRIO Heizdeckel

Phasenkontrastmikroskop ULWCD 0.30

pH-Meter 320

Pipetboy acu

Pipetten Reference (0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl;  
50-250 µl; 200-1000 µl; 500-2500 µl)

Plattenlesegerät EL 340 Bio Kinetics Reader

Plattenlesegerät SPECTRA FLUOR

Reinraumwerkbank Typ DLF/BSS6 KLIIA

Schüttler KL2

Schwenker WT16

Scintillationsmeßgerät Wallac 1409

Semi-dry Blotapparatur

Spektrophotometer Biochrom-4060

Spektrophotometer U-1100

Steril-Bank Lamin Air HBB 2472

Thermomixer 5436

UV Crosslinker UVC1000

Vortexer VF2

Wasseraufbereiter Milli-Q Plus

Wasserbad 1083

Wasserbad Certomat® WR

Zählkammer Fuchs-Rosenthal

#### Zentrifugen:

GS-6KR Zentrifuge (GH 3.8 Rotor)

Optima™ TL Ultrazentrifuge (Rotor TLA 100.3)

Tischzentrifuge 5415C, ohne Kühlung

Tischzentrifuge 5417R, mit Kühlung

Olympus (Hamburg, D)

Mettler Toledo (Schwerzenbach, CH)

Integra Bioscience (Fernwald, D)

Eppendorf (Hamburg, D)

BioTek (Winooski, USA)

Tecan (Crailsheim, D)

CAT (Stuttgart, D)

Edmund Bühler (Thübingen, D)

Biometra (Göttingen, D)

Wallac (Freiburg, D)

Biometra (Göttingen, D)

Pharmacia (Erlangen, D)

Hitachi (Yokohama, J)

Heraeus (Hanau, D)

Eppendorf (Hamburg, D)

Hoefer (San Francisco, USA)

IKA-Labortechnik (Staufen, D)

Millipore (Schwalbach, D)

GFL (Burgwedel, D)

B. Braun (Melsungen, D)

Superior (Marienfeld, D)

Beckman-Coulter

(Unterschleißheim-Lohhof, D)

Beckman-Coulter

(Unterschleißheim-Lohhof, D)

Eppendorf (Hamburg, D)

Eppendorf (Hamburg, D)



**2.1.7 Verbrauchsmaterial**

Blotmembran Hybond N <sup>+</sup>	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Chromatographiepapier 3MM CHR	Whatman (Maidstone, UK)
Einmal-Küvetten Plastibrand <sup>®</sup>	Brand (Wertheim, D)
<u>Fotomaterial:</u>	
- Röntgenfilm Biomax MR	Kodak (Stuttgart, D)
- Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
- Entwickler RP X-OMAT EX	KODAK (Rochester, USA)
- Fixierer RP X-OMAT LO	KODAK (Rochester, USA)
- Druckerpapier Typ II UPP-110 HD	Sony (Tokyo, J)
Handschuhe SaveSkin SatinPLUS	Kimberly-Clark (Mühlheim-Kärlich, D)
Klebeband Tesa transparent	Beiersdorf (Hamburg, D)
Paketklebeband Tesa	Beiersdorf (Hamburg, D)
Parafilm	Roth (Karlsruhe, D)
Pipettenspitzen (20, 100, 1000, 2500 µl)	Eppendorf (Hamburg, D)
Protran BA 85 Zellulosenitrat	Schleicher & Schuell (Dassel, D)
Reaktionsgefäße Safe Lock (500, 1500, 2000 µl)	Eppendorf (Hamburg, D)
Röhrchen (15 und 50 ml)	Nunc (Wiesbaden, D)
<u>Zellkultur:</u>	
Schalen (35x10, 100x20, 150x25 mm)	BD (Heidelberg, D)
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	BD (Heidelberg, D)
Kulturflaschen (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	BD (Heidelberg, D)
Platten (je 6, 12, 96 Vertiefungen)	BD (Heidelberg, D)

**2.1.8 Biologisches Material**

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Karzinomzelllinien wurden freundlicherweise vom Zellkulturlabor des Instituts für Pathologie der Charité zur Verfügung gestellt (Tab. 2.2).

**Tab. 2.2: Humane Karzinomzelllinien.**

Name	Diagnose	Selektion	Referenz
A2780	Ovarialkarzinom	-	Eva <i>et al.</i> , 1982
A2780RCIS10	Ovarialkarzinom	Cisplatin	nicht publiziert
Mewo	Melanom	-	Fogh <i>et al.</i> , 1978
MewoRCIS1	Melanom	Cisplatin	Kern <i>et al.</i> , 1997
D43/86	Nebennierenrindenzellkarzinom	-	nicht publiziert
D43/86RCIS2	Nebennierenrindenzellkarzinom	Cisplatin	nicht publiziert

Bei dem verwendeten Bakterienstamm *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen) handelt es sich nach den Angaben des Herstellers um folgenden Genotyp:

F' {*lacI*<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *gal/K* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*.

### 2.1.9 Computer und Software

#### Internet-Recherche

Netscape Explorer, Version 4.01

Netscape (Mountain View, USA)

Sequenzabgleich (BLAST)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

#### RNA-Faltung

DNASIS, Version 3.0

Hitachi (Yokohama, J)

mFOLD, Version 3.1

<http://bioinfo.math.rpi.edu>

Washington University

(St. Louis, USA)

#### Text-, Tabellen-, Abbildungsbearbeitung

MS Office, Version 7.0

Microsoft (Redmont, USA)

Origin, Version 5.0

Microcal Software

(Northampton, USA)

GraphPad Prism<sup>®</sup>, Version 3.02

GraphPad Software (San Diego, USA)

Molecular Analyst, Version 1.4

BioRad (Richmond, USA)

Adobe Photoshop, Version 5.0 LE

Adobe (San Jose, USA)

---

FACS-Messungen

Cellquest, Version 1.2.2

BD (Heidelberg, D)

Caspase-Assay

easyWin screening V6.0a

Tecan (Crailsheim, D)

ELISA-Reader

KinetiCalc Version 2.12

Bio Tek (Winooski, USA)

Spektrophotometer Biochrom-4060

VWSS Version 2.0

Pharmacia (Erlangen, D)

LightCycler

LightCycler Software Version 3

Roche (Mannheim, D)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle eukaryotischen Zellen wurden im Inkubator (BBD6220, Heraeus) bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit in Gegenwart von 5 % CO<sub>2</sub> in modifiziertem L-15-Medium angezogen. Den cisplatinresistenten Zelllinien wurden folgende Mengen Cisplatin zugesetzt: A2780RCIS 10 µg/ml, D43/86RCIS 2 µg/ml und MewoRCIS 1 µg/ml Medium.

Zweimal wöchentlich wurde der Zustand der Zellen mikroskopisch beurteilt ( Zelldichte, eventuelle Infektionen oder abgestorbene Zellen). Je nach den Erfordernissen wurden die Zellen trypsiniert (50-100 µl Trypsin-Lösung/cm<sup>2</sup> Zellkulturgefäßboden; Inkubation bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen), um ihre Anzahl im Zellkulturgefäß zu verringern oder nur ein Mediumwechsel durchgeführt.

#### modifiziertes L-15-Medium

FKS	10 %	Die sterilen Substanzen wurden 500 ml L-15-Medium zugegeben.
L-Glutamin	1,0 mM	
Transferrin	1,25 mg	
Fetuin	3,75 mg	
Insulin	40 IE	
Trasyol <sup>®</sup> (Aprotinin)	0,002 % (v/v)	
NaHCO <sub>3</sub>	0,1125 % (w/v)	
Glukose	0,05 % (w/v)	
MEM-Vitamine	1 x	

#### Trypsin-Lösung

Die Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom AG) enthält 0,5 % Trypsin und 0,2 % EDTA in 10 x PBS. Diese Lösung wurde vor Gebrauch 1:10 mit autoklaviertem *A. bidest.* verdünnt und sterilfiltriert.

### **2.2.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen**

Die Zellen wurden bei Konfluenz trypsiniert, 1:1 mit Medium versetzt, um das Trypsin zu inhibieren, und 5 min bei 950 rpm und 25 °C zentrifugiert (Zentrifuge: GS-6KR, Beckman-Coulter, 200 x g). Das Zellpellet wurde in 95 % FKS und 5 % DMSO resuspendiert (ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml). Diese Zellsuspension wurde in Aliquots von je 1 ml in Einfrierröhrchen überführt. Über Nacht wurden diese Röhrchen in einer mit Isopropanol gefüllter Einfrierbox langsam auf –80 °C abgekühlt. Danach wurden die Röhrchen in andere Boxen umgelagert und weiterhin bei –80 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die Röhrchen aufgetaut und die Zellsuspension in ein Zellkulturgefäß mit modifiziertem L-15-Medium gegeben. Nach dem Anheften der Zellen, spätestens jedoch nach 24 h, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

### **2.2.3 Transfektion der Zelllinien A2780 und A2780RCIS**

Die Transfektionen wurden mit Hilfe des DMRIE-C-Reagenzes (GibcoBRL) durchgeführt. Es wurden Zellen der Linie A2780 bzw. A2780RCIS (ohne Zytostatikum im Medium) in Zellkulturgefäßen mit 3,5 cm Durchmesser ausgesät und mindestens 24 h bis zu einer Konfluenz von 30-50 % kultiviert. Plasmid-DNA (Kap. 2.2.6) wurde mit 1/10 3 M Natriumazetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol 30 min bei –20 °C gefällt und anschließend 20 min bei 4 °C und 14 000 rpm (Zentrifuge: 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 µl sterilem 10 x PCR-Puffer (inklusive 15 mM MgCl<sub>2</sub>, Perkin Elmer) aufgenommen, unter sterilen Bedingungen ein Aliquot abgenommen und die DNA-Menge spektrophotometrisch bestimmt. 2 µg Plasmid-DNA wurden zu 1 ml OPTI-MEM gegeben. 5 µl DMRIE-C-Reagenz wurden in einem zweiten Röhrchen in ebenfalls 1 ml OPTI-MEM aufgenommen. Die beiden Lösungen wurden zueinander gegeben und vorsichtig gemischt. Damit sich die Lipid-DNA-Komplexe bilden konnten, wurde die Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zellrasen wurde 1 x mit 2 ml OPTI-MEM gewaschen und das Medium mit den Lipid-DNA-Komplexen zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 5 h mit dieser Lösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Transfektionslösung wurde entfernt, 2,5 ml modifiziertes L-15-Medium zu den Zellen gegeben und die Zellen wie gewohnt weiter kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen trypsiniert und auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser umgesetzt. Gleichzeitig wurden die Zellen ab diesem Zeitpunkt unter einem Selektionsdruck von 800 µg/ml G418 gehalten. Nach ca. 2 Wochen konnten die

heranwachsenden Klone gepickt und auf Zellkulturgefäße mit 1 cm Durchmesser umgesetzt werden. Die Zellen wurden im Folgenden dauerhaft unter Selektionsdruck gehalten. Die Zellen auf einer Kontrollplatte, die mit einer Lipid-Lösung ohne DNA transfiziert wurde, starben innerhalb einer Woche nach der Transfektion unter Selektionsdruck vollständig ab.

#### 2.2.4 Kultur von Bakterien

##### Plattenkulturen

*E.coli*-Kulturen wurden auf LB-Agar-Platten (Schalen mit 10 cm Durchmesser und 20 ml LB-Agar), die 100 µg/ml Ampicillin oder Carbenicillin enthielten, mittels Spatel ausplattiert und bei 37 °C im Brutschrank für 16-20 h angezogen.

##### LB-Agar

Bacto <sup>®</sup> Agar	1,5 % (w/v)	Die Komponenten wurden in <i>A. bidest.</i> gelöst und autoklaviert.
Bacto <sup>®</sup> Trypton	1,0 % (w/v)	
Bacto <sup>®</sup> Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	
NaCl, pH 7,0	170 mM	

##### Schüttelkulturen

*E. coli*-Kulturen wurden in 5 ml-Ansätzen über Nacht in LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin oder Carbenicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) bei 37 °C unter Schütteln bei 160 rpm angezogen.

##### LB-Medium

Bacto <sup>®</sup> Trypton	1 % (w/v)	Die Komponenten wurden in <i>A. bidest.</i> gelöst und autoklaviert.
Bacto <sup>®</sup> Hefeextrakt	0,5 % (w/v)	
NaCl, pH 7,0	170 mM	

##### Anlage von Stammkulturen

Zur langfristigen Lagerung wurden Bakterien nach Schüttelkultur in LB-Medium mit 20 % (v/v) Glycerin aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Zur Reaktivierung wurden diese Stammkulturen aufgetaut und einige µl in LB-Medium unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin oder Carbenicillin erneut als Schüttelkultur herangezogen.

### 2.2.5 Transformation von *E. coli*

Für die Transformationen wurde der One Shot™ Reagent-Kit (Invitrogen) verwendet. Zu 50 µl auf Eis aufgetauter Bakteriensuspension (TOP10F'-*E. coli*-Stamm) wurden 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol gegeben, vorsichtig gemischt, 2 µl ligiertes Plasmid (Kap. 2.2.18) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Die Bakterien wurden erneut auf Eis gestellt und nach ca. 2 min unter sterilen Bedingungen 250 µl SOC-Medium zugegeben. Die transformierten Bakterien wurden 1 h bei 37 °C unter Schütteln von 170 rpm inkubiert, 100 µl Bakteriensuspension auf vorbereitete LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht kultiviert (Kap. 2.2.4).

### 2.2.6 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep-Spin-Plasmid-Kit (Qiagen) isoliert. 4 ml der Übernachtskulturen von *E. coli* wurden bei 3000 rpm und Raumtemperatur für 5 min pelletiert (Zentrifuge: 5415C, Eppendorf) und nach Protokoll weiterbehandelt. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

### 2.2.7 Behandlung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion der DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen für das jeweilige Restriktionsenzym in 20 µl-Ansätzen. Nach Zugabe der Restriktionsendonuklease (10 U) und dem dazu passenden Puffer wurden die Ansätze mit Plasmid-DNA bei 37 °C ca. 2 h oder über Nacht inkubiert.

### 2.2.8 Präparation von RNA

Gesamt-RNA wurde aus eukaryotischen Zellen unter Verwendung von Trizol® (GibcoBRL) isoliert. Die Zellen wurden unter Zugabe von 1 ml Trizol®/10 cm<sup>2</sup> bewachsene Fläche in ihrem Zellkulturgefäß lysiert und dieses Lysat in ein phenolbeständiges 15 ml-Röhrchen überführt. Pro ml Trizol wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben, ca. 15 s intensiv geschüttelt

und für weitere 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden 15 min bei 4 °C und 3000 rpm (Zentrifuge: GS-6KR, Beckman-Coulter, 2060 x g) zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt. Unter Zugabe von 0,5 ml Isopropanol (pro ml zu Beginn eingesetztes Trizol®) wurde die RNA bei –20 °C über Nacht gefällt. Danach wurde sie durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C innerhalb von 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 70 %igem Ethanol in DEPC-Wasser (0,2 % DEPC in *A. bidest.*, autoklaviert) gewaschen, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und nochmals 5 min bei 4 °C und 9500 rpm (Zentrifuge: 5417R, Eppendorf) abzentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

### 2.2.9 Agarosegel-Elektrophorese von RNA

Der aufzutrennenden RNA wurde 1,8 Volumen RNA-Ladepuffer zugesetzt. Die Proben wurden bei 65 °C denaturiert, danach sofort auf Eis überführt und nach dem Abkühlen aufgetragen. Die gelchromatographische Auftrennung erfolgte bei 75 V in 1,0 %igen Agarosegelen in 1 x MOPS-Puffer und 6 % Formaldehyd. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS-Puffer verwendet. Zur Orientierung wurden in einer zusätzlichen Bahn 1 µl farbstoffenthaltender 6 x Blue/Orange Loading Dye (Promega) aufgetragen.

#### 25 x MOPS-Puffer

MOPS, pH 7,0	5 M	Der Puffer wurde im Dunkeln gelagert. Der pH-Wert wurde mit 1 M Essigsäure eingestellt.
Natriumazetat	12,5 M	
Na <sub>2</sub> EDTA	0,25 M	

in *A. bidest.*

#### RNA-Auftragepuffer

Formamid	570 µl
Formaldehyd (37%ig)	170 µl
25 x MOPS	60 µl
Ethidiumbromid-Lösung	4 µl



### 2.2.10 Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren wurde am UV-Spektrophotometer (Hitachi) bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Für die Bestimmung der Konzentrationen wurden folgende Umrechnungsfaktoren berücksichtigt: 1 OD entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA.

### 2.2.11 Northern-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von RNA (Kap. 2.2.9) wurde das Agarosegel 30 min durch Schwenken in *A. bidest.* gewaschen. Die RNA wurde über Nacht unter Verwendung von 10 x SSC als Transferpuffer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech) transferiert (Kapillarblot nach Sambrook und Russell, 2001). Die Blot-Effektivität wurde durch Vergleich von Gel und Membran auf dem UV-Transilluminator (MWG-Biotech) kontrolliert. Im UV-Crosslinker (Hoefer) wurde die RNA mit der Nylonmembran quervernetzt (0,12 mJ/cm<sup>2</sup>). Diese Blots konnten entweder sofort verwendet oder trocken bei Raumtemperatur gelagert werden.

#### 20 x SSC

NaCl	3,0 M	Der pH-Wert wurde mit 1 M
Na <sub>3</sub> -Zitrat, pH 7,0	0,3 M	Essigsäure eingestellt.

in *A. bidest.*

### 2.2.12 Markierung von DNA-Sonden

Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde das Megaprime<sup>TM</sup> DNA Labelling System (Amersham) verwendet. 25 ng der zu markierenden DNA wurden in 28 µl *A. bidest.* aufgenommen und 5 µl Hexanukleotid-Zufallsprimer dazugegeben. Die DNA-Doppelstränge wurden bei 95 °C aufgeschmolzen. Während das Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur verblieb, wurden 10 µl 5 x Markierungspuffer, 5 µl <sup>32</sup>P-dCTP (50 µCi) und 2 µl (1 U/µl) DNA-Polymerase I-Klenow-Fragment zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Markierung erfolgte bei 37 °C für 30 min. Anschließend wurde die DNA erneut bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

### 2.2.13 Northern-Hybridisierung

Die Blots (Kap. 2.2.11) wurden bei 58 °C für mindestens eine Stunde in ExpressHyb™ Hybridisierungslösung (Clontech) prähybridisiert. Danach wurde die markierte Sonde (Kap. 2.2.12) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 58 °C. Die nicht gebundene DNA wurde am nächsten Tag in vier aufeinanderfolgenden Waschschritten entfernt: 2 x 15 min bei Raumtemperatur mit 2 x SSC (Kap. 2.2.12)/0,1 % SDS und 2 x 15 min bei 58 °C in 0,1 x SSC/0,1 % SDS. Die Exposition der Blots erfolgte auf Röntgenfilm (Kodak).

#### Entfernung von gebundenen Sonden

Eine 0,1 %ige SDS-Lösung in *A. bidest.* wurde hergestellt und aufgekocht. Die bereits benutzte Membran wurde in die Lösung gegeben und 30 bis 60 min in der sich abkühlenden Flüssigkeit inkubiert. Danach konnte sie erneut für eine Hybridisierung verwendet werden.

### 2.2.14 Reverse Transkription

Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde unter Verwendung des Superscript Preamplification System for First Stand cDNA Synthesis (GibcoBRL) in cDNA nach den Angaben des Herstellers umgeschrieben. Es wurden Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz als Primer verwendet, um pro Ansatz 2 µg Gesamt-RNA umzuschreiben. Die cDNAs wurden 1:50 für RT-PCR bzw. 1:5 für die Quantifizierung mittels *real-time*-RT-PCR in *A. bidest.* verdünnt.

### 2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

<u>PCR mit AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase:</u>	<u>in µl</u>	<u>im Ansatz</u>
10 x PCR-Puffer (inklusive 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2, 5	1 x
dNTPs (je 10 mM)	0,5	200 µM
5'-Oligonukleotidprimer (5 µM)	1	200 nM
3'-Oligonukleotidprimer (5 µM)	1	200 nM
Matrix-DNA (cDNA 1:50)	10	50-100 ng
AmpliTaq Gold™	0,2	1 U
<i>A. bidest.</i>	auf 25	

Die Amplifikation erfolgte im PCR-Thermal Cycler (Biometra) nach folgendem Programm:

1. Thermische Aktivierung der Polymerase: 12 min, 94 °C;
2. DNA-Amplifikation in 36 Zyklen, bestehend aus
  - 2.1 Denaturierung der Doppelstrang-DNA: 60 s, 94 °C;
  - 2.2 Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzen: 90 s, bei  $T_H$  (Tab. 2.3);
  - 2.3 Elongation der Primer: 90 s, 72 °C;
3. Extension: 5 min, 72 °C
4. Abkühlung: ohne Zeitvorgabe, 4 °C.

**Tab. 2.3: Primer-Hybridisierungstemperaturen ( $T_H$ ) der durchgeführten PCRs.**

5'-Primer	3'-Primer	$T_H$ (°C)	Zweck der PCR
cMOAT-a1	cMOAT-b1	55	Expressionsvergleich <sup>a</sup> , Einsatz als Sonde im Northern-Blot <sup>a</sup> , Quantifizierung der Expression <sup>c</sup>
9-MOAT-fw	11-MOAT-rev	52	Amplifikation des offenen Leserahmens von MRP2/cMOAT/ABCC2 <sup>b,d</sup>
2-MOAT-fw	3-MOAT-rev	55	Punktmutationsanalyse in MRP2 <sup>a,d</sup>
GAPDH-fw	GAPDH-rev	55	Quantifizierung der Expression <sup>c</sup> , Einsatz als Sonde im Northern Blot <sup>a</sup>
G3PDH-a1	G3PDH-b1	55	Expressionsvergleich <sup>a</sup>
Pgp-fw	Pgp-rev	50	Expressionsvergleich <sup>a</sup>
PMS2-fw	PMS2-fw	60	Expressionsvergleich <sup>a</sup>
hMLH1-fw	hMLH1-rev	55	Expressionsvergleich <sup>a</sup>
hMSH2-fw	hMSH2-rev	55	Expressionsvergleich <sup>a</sup>
LRP-a3	LRP-a3	60	Expressionsvergleich <sup>a</sup>
BCRP-fw	BCRP-rev	50	Expressionsvergleich <sup>a</sup>
MRP-a	MRP-b	60	Expressionsvergleich <sup>a</sup>
TP53-fw	TP53-rev	56	Mutationsanalyse <sup>a,d</sup>
T7MOAT-fw3	MOAT-rev2	62	Matrix-DNA für <i>in-vitro</i> -Transkription <sup>a</sup>
T7MOAT-fw3	MOAT-rev3	62	Matrix-DNA für <i>in-vitro</i> -Transkription <sup>a</sup>
vector-fw	vector-rev	55	Insertkontrolle nach Klonierung in pcDNA3.1 <sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> PCR mit AmpliTaq-Gold-DNA-Polymerase

<sup>b</sup> RT-PCR mit Advantage<sup>®</sup>-Polymerase-Mix

<sup>c</sup> *real-time*-RT-PCR im Lightcycler

<sup>d</sup> Zusatz von Betain (Endkonzentration: 1 M) und DMSO (Endkonzentration: 5 %)

RT-PCR mit Advantage®-Polymerase-Mix:

Der Advantage®-Polymerase-Mix (Clontech) enthält die KlenTaq-1-DNA-Polymerase, eine weitere Polymerase, die eine 3'-5'-Korrekturleseaktivität besitzt, und den TaqStart™-Antikörper, damit eine automatische *hot start*-PCR ermöglicht wird. Dieser Polymerase-Mix bietet durch seine besondere Zusammensetzung u. a. die Möglichkeit, besonders lange PCR-Fragmente zu amplifizieren. Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

	<u>in µl</u>	<u>im Ansatz</u>
10 x PCR-Puffer	2,5	1 x
dNTPs (je 10 mM)	1,0	400 µM
5'-Oligonukleotidprimer (5 µM)	1	200 nM
3'-Oligonukleotidprimer (5 µM)	1	200 nM
Betain (5 M)	5	1 M
DMSO (50 %ig)	2,5	5 %
Matrix-DNA (cDNA 1:50)	10	50-100 ng
50 x Advantage®-Polymerase-Mix	1,0	2 x
<i>A. bidest.</i>	auf 25	

Die Amplifikation erfolgte im PCR-Thermal Cycler (Biometra) nach folgendem Programm:

1. Initiale Denaturierung: 1 min, 94 °C;
2. DNA-Amplifikation in 36 Zyklen, bestehend aus
  - 2.1 Denaturierung der Doppelstrang-DNA: 30 s, 94 °C;
  - 2.2 Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzen: 30 s, bei T<sub>H</sub> (Tab. 2.3);
  - 2.3 Elongation der Primer: 6 min, 68 °C;
3. Extension: 6 min, 68 °C
4. Abkühlung: ohne Zeitvorgabe, 4 °C.

Real-time-RT-PCR im Lightcycler:

Die Lightcycler-Technologie (Roche) bietet die Möglichkeit, den Verlauf einer PCR am Computer-Monitor mitzuverfolgen und aufgrund einer mitlaufenden Standardreihe mittels mathematischen Methoden auf die Ausgangsmolekülzahl in einer Probe für eine bestimmte Matrize zu schließen. Die PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

---

	<u>in <math>\mu</math>l</u>	<u>im Ansatz</u>
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,4	4 mM
5'-Oligonukleotidprimer (10 $\mu$ M)	1,0	500 nM
3'-Oligonukleotidprimer (10 $\mu$ M)	1,0	500 nM
DNA Master SYBR Green I	2,0	1 x
<i>A. bidest.</i>	auf 18	
Matrix-DNA (cDNA 1:5)	2,0	100-200 ng

In einem Lauf konnten bis zu 32 PCRs gleichzeitig durchgeführt werden. Es wurden bei jedem Lauf eine Nullkontrolle (*A. bidest.*) und eine Standardreihe von 6 bis 8 Proben (in 2er oder 10er Verdünnungsstufen) mitgeführt. Vor jeder Quantifizierung wurde der spezifische Meßpunkt für eine PCR bestimmt. Dazu wurde eine Probe-PCR für die Matrize durchgeführt und die Schmelzkurve für das Produkt analysiert. Die Meßtemperatur ( $T_{\text{Meß}}$ ) wurde so ausgewählt, daß sie knapp vor dem Abschmelzen des PCR-Produktes lag. Bei dieser Temperatur liegen eventuelle Primer-Dimere bereits als DNA-Einzelstränge vor und werden somit nicht mitgemessen.

Die Amplifikation erfolgte im LightCycler (Roche) nach folgendem Programm:

1. Initiale Denaturierung: 10 min, 95 °C;
2. DNA-Amplifikation in 40-50 Zyklen, bestehend aus
  - 2.1 Denaturierung der Doppelstrang-DNA: 15 s, 95 °C;
  - 2.2 Hybridisierung der Primer an die komplementären Sequenzen: 5 s, bei  $T_H$  (Tab. 2.3);
  - 2.3 Elongation der Primer: 10 s, 72 °C;
  - 2.4 Meßpunkt: ohne Zeit,  $T_{\text{Meß}}$ , messen;
3. Schmelzkurve: ohne Zeit, 95 °C; 15 s, 65 °C; in 0,1 °C/s auf 95 °C, fortwährend messen;
4. Abkühlung: 30 s, 40 °C.

### 2.2.16 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Die gelchromatographische Auftrennung von DNA erfolgte bei 85 V in 1,0-1,5 %igen Agarosegelen mit 1 x TAE als Laufpuffer. Die Gele enthielten 0,2  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid. Den Proben wurde anteilig 6 x Blue Orange Loading Dye (Promega) zugesetzt. Nach dem

Gellauf wurden die Banden durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

### 50 x TAE

Tris-Azetat, pH 8,0	2,0 M	Der pH-Wert wurde mit 1 M
Na <sub>2</sub> EDTA	50 mM	Essigsäure eingestellt

in *A. bidest.*

### **2.2.17 Elution von DNA-Fragmenten**

Nach Agarosegel-Elektrophorese (Kap. 2.2.16) wurde die DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für die Gelelution wurde der QIAquick Gel Extraction-Kit (QIAGEN) verwendet und nach dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Die DNA wurde in 30 oder 50 µl Elutionspuffer aufgenommen.

### **2.2.18 Ligation von DNA-Fragmenten**

#### Ligation mit T4-DNA-Ligase:

	<u>im Ansatz</u>
Plasmid pcDNA3.0, geschnitten <i>KpnI/XbaI</i> (Kap. 2.2.7), nach Gelelution (Kap. 2.2.17)	0,3-0,4 pmol
Ribozym-DNA, hybridisiert (Kap. 2.2.21)	100 pmol
10 x One-Phor-All Buffer PLUS	1 x
T4-DNA-Ligase FPLCpure <sup>®</sup>	12 U
ATP	1 mM
<i>A. bidest.</i>	auf 20 µl

Die Ligation erfolgt über Nacht bei 12 °C.

#### Ligation von PCR-Produkten:

Die Ligation erfolgte mit den Kits TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Vektor: pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO) und Eukaryotic TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Vektor: pcDNA3.1/V5/His-Topo) von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.19 Sequenzierung von DNA

Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt. Anschließend wurde die Sequenzierung von Dr. Martin Meixner am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Es wurden der DNA-Sequenzierautomat ABI-373 und der ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet.

### 2.2.20 Identifikation potentieller Ribozym-Schnittstellen in der MRP2-mRNA

Um für Ribozyme gut zugängliche Sequenzen in der Ziel-mRNA zu identifizieren, wurden die Programme DNASIS 3.0 (Hitachi) und mFOLD 3.1 (<http://bioinfo.math.rpi.edu>) genutzt. Da die Gesamt-mRNA für eine Faltungsanalyse zu lang war (die vom Anbieter gesetzten Grenzen liegen bei 3000 nt), wurden innerhalb der MRP2-mRNA kürzere Bereiche (Größe 1000 bis 2000 nt) gewählt. Bei der Auswahl der Ribozyme wurde diejenige potentielle Sekundärstruktur betrachtet, die über die geringste freie Energie  $\Delta G$  verfügt (Zarrinkar und Williamson, 1994; Zuker und Stiegler, 1981).

### 2.2.21 Ribozym-DNA-Matrizen für die *in vitro*-Transkription

Um die ausgewählten Ribozyme *in vitro* mittels T7-Polymerase transkribieren zu können, müssen die Ribozym-DNA-Matrizen eine vorangestellte T7-Promotorsequenz besitzen. Die Einzelstrang-Oligonukleotide RcMAT7-fw/rev und RcMBT7-fw/rev wurden chemisch synthetisiert (Tab. 2.1). Je 2,5 nmol T7-Promotor-Ribozym-Oligonukleotid (fw und rev) wurden zusammengegeben und folgendes Temperaturprotokoll durchgeführt:

1. Denaturierung der ssDNA-Oligonukleotide: 2 min 94 °C;
2. Hybridisierung der ssDNA-Oligonukleotide: 8 min 70 °C;
3. Abkühlung der dsDNA-Oligonukleotidlösung: auf 4 °C.

### 2.2.22 *in vitro*-Transkription

Als Matrizen für die *in vitro*-Transkription wurden die zu Doppelsträngen hybridisierten T7-Promotor-Ribozym-Oligonukleotide (Kap. 2.2.21) und PCR-Produkte für die Substrate mit vorangestelltem T7-Promotor verwendet (Kap. 2.2.15, Tab. 2.3). Die Reaktionsansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

	<u>in <math>\mu</math>l</u>	<u>im Ansatz</u>
10 x T7-Transkriptionspuffer	4	1 x
NTPs	2,5	625 $\mu$ M
RNaseOUT (RNase-Inhibitor)	1	40 U
[ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP	1	312,5 nM
T7-Polymerase	1	50 U
<i>A. bidest.</i>	auf 40	

Die Ansätze wurden 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 10  $\mu$ l 3 x PAGE-Auftragepuffer abgestoppt.

#### 3 x PAGE-Auftragepuffer

Harnstoff	8 M	Der Puffer wurde bei –20°C gelagert.
Glycerol	8,7 % (v/v)	
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)	
Xylencyanol	0,02 % (w/v)	
Orange G(w/v)	0,02 %	
in <i>A. bidest.</i>		

### 2.2.23 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) von RNA

Die Auftrennung der *in vitro*-Transkriptionsprodukte sowie die Charakterisierung der Ribozyme durch zeit- und substratabhängige Kinetiken erfolgte mittels PAGE in 1 x TBE als Laufpuffer. Das Gel setzte sich wie folgt zusammen:



---

	<u>Menge</u>	<u>im Ansatz</u>
Harnstoff	42 g	7 M
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %ig)	20 ml	8 % (v/v)
10 x TBE	10 ml	1 x
in A. bidest.		

Die Bestandteile wurden zusammengegeben, der Harnstoff gelöst und die Lösung durch Filtern entgast. Für die Polymerisierung wurden weiterhin zugegeben:

APS (10 %ig in A. bidest.)	800 µl
TEMED	80 µ

#### 10 x TBE

Tris/HCl, pH 8,0	0,9 M	Der pH-Wert wurde mit 1 M
Borsäure	0,9 M	HCl eingestellt
Na <sub>2</sub> EDTA	25 mM	
in A. bidest.		

Die Auftrennung erfolgte bei kurzen Gelen (Länge: 20 cm) zunächst 20 min bei 15 W, anschließend bis zur kompletten Auftrennung bei 25 W. Bei langen Gelen (Länge: 42 cm) erfolgte der Lauf zuerst 30 min bei 20 W, danach bis zur vollständigen Auftrennung bei 40 W. Nach Exposition auf Röntgenfilm (Kodak) bei -80 °C konnten die *in vitro*-Transkriptionsprodukte nach ca. 15 min bzw. bei analytischen Gelen die Ausgangs- und Spaltprodukte eines Schnittversuchs nach 1-3 Tagen sichtbar gemacht werden.

#### **2.2.24 Elution und Fällung von RNA aus Polyacrylamidgelen**

Röntgenfilm und Polyacrylamidgel wurden zur Deckung gebracht. In Höhe der Banden auf dem Film wurde der entsprechende Gelbereich ausgeschnitten, die Probe in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit einer Pipettenspitze zerkleinert. Nach Zugabe von 400 µl RNA-Elutionspuffer wurden die Proben durch sequenzielles Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37 °C weiter aufgeschlossen. Die Proben wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 5 min

bei 14 000 rpm (Zentrifuge: 5415C, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die eluierte RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Natriumazetat, 2,5 Volumen Ethanol und 5 µg Glykogen für 3 h bei –70 °C gefällt. Die RNA wurde 1 h bei 14 000 rpm (Zentrifuge: 5415C, Eppendorf) pelletiert, kurz mit 70 %igem Ethanol in DEPC-Wasser (Kap. 2.2.8) gewaschen und erneut für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und im β-Counter Wallac 1409 (Wallac) vermessen.

#### RNA-Elutionspuffer

Tris/HCl, pH 8,0	500 mM	Der Puffer wurde vor Gebrauch sterilfiltriert. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt.
Na <sub>2</sub> EDTA	1 mM	
MgCl <sub>2</sub>	0,1 mM	
SDS	0,1 % (w/v)	
in <i>A. bidest.</i>		

#### **2.2.25 Bestimmung der Stoffmenge radioaktiv markierter RNA**

Die Stoffmenge radioaktiv markierter RNA kann aus der im β-Counter gemessenen Strahlung berechnet werden.

$$A = \frac{A_{kal}}{2^{\frac{t_{kal}}{t_{1/2}}}}$$

A = eingesetzte Aktivität [Bq]

A<sub>kal</sub> = eingesetzte Aktivität zum Zeitpunkt der Kalibrierung [Bq]

t<sub>kal</sub> = Zeit der Kalibrierung [d]

t<sub>1/2</sub> = Halbwertszeit des eingesetzten Isotopes [d]

In die Berechnung ging außerdem der Faktor W ein, der den Einbau von unmarkiertem UTP an einer beliebigen Position des transkribierten Moleküls beschreibt. Dieser Faktor wird aus dem Quotienten der Stoffmenge eingesetzten unmarkierten UTPs und der Anzahl von UMPs je transkribiertem Molekül berechnet:

$$W = \frac{n_{UTP}}{N_{UMP}}$$

W = Faktor für zufälligen Einbau unmarkierten UTPs [nmol]

$n_{UTP}$  = eingesetztes unmarkiertes UTP [nmol]

$N_{UMP}$  = Anzahl der UMPs im transkribierten Molekül

Somit ergibt sich die Stoffmenge des Transkriptes  $n_{Transkript}$  aus dem Produkt der gemessenen Radioaktivität der Probe  $A_{meß}$  und dem Quotienten  $W/A$ :

$$n_{Transkript} = A_{meß} \cdot \frac{W}{A}$$

$n_{Transkript}$  = Stoffmenge des Transkriptes [nmol]

$A_{meß}$  = gemessene Radioaktivität [Bq]

W = Faktor für zufälligen Einbau unmarkierten UTPs [nmol]

A = eingesetzte Aktivität [Bq]

### 2.2.26 *in vitro*-RNA-Prozessierung

Die ribozymatische Spaltung der RNA *in vitro* wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl unter Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen Substrat und Ribozym (Tab. 2.4) in 1 x Ribozym-Puffer bei 37 °C durchgeführt. Nach bis zu fünfstündiger Inkubation wurden die Ansätze mit 10 µl 3 x PAGE-Auftragepuffer (Kap. 2.2.22) versetzt.

#### 10 x Ribozym-Puffer

Tris/HCl, pH 7,5	400 mM	Der Puffer wurde vor Gebrauch
MgCl <sub>2</sub>	120 mM	sterilfiltriert. Der pH-Wert wurde
in <i>A. bidest.</i>		mit 1 M HCl eingestellt

**Tab. 2.4: Reaktionsbedingungen bei der RNA-Prozessierung.**

	Nachweis der Aktivität	Bestimmung von $v_{ini}$ und $k_{obs}$	Bestimmung von $k_{cat}/k_M$
c[Substrat]	200 nM	20 nM	40 nM
c[Ribozym]	200 nM	100 nM	0; 20; 40; 80; 120; 200; 300; 400 nM
t	120 min	0; 0,5; 1; 2; 3; 5; 10; 15 min 20; 30; 60; 120; 180; 300 min	

### 2.2.27 Berechnung der Reaktionsparameter der ribozymatischen Spaltung

Die Initialgeschwindigkeit  $v_{ini}$  der ribozymatischen RNA-Spaltung bezeichnet die Geschwindigkeit der Umsetzung des ungespaltenen RNA-Substrates S in die beiden Spaltprodukte P bei anfänglichem Substratüberschuß. Sie wird aus dem Quotienten der Stoffmenge des gebildeten Produktes P zum Zeitpunkt t errechnet (Hendry *et al.*, 1997):

$$v_{ini} = \frac{n(P_t)}{t}$$

$v_{ini}$  = Initialgeschwindigkeit [ $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$n(P_t)$  = Stoffmenge der Spaltprodukte zum Zeitpunkt t [mol]

t = Reaktionszeit [s]

Die Initialgeschwindigkeit entspricht dabei dem Anstieg im angenommenen linearen Anfangsbereich des Graphen  $n(P_t) = f(t)$ , da dieser Bereich die Reaktion unter Substratüberschuß widerspiegelt.

Der Reaktionsparameter  $k_{cat}/k_M$  (nach Heidenreich & Eckstein, 1992) wurde aus der ribozym-konzentrationsabhängigen Spaltung des RNA-Substrates nach folgender Gleichung berechnet:

$$S_u = 1 - P_t = e^{-t \cdot c_{Rz} \cdot \frac{k_{cat}}{k_M}} \quad 0 \leq S_u \leq 1$$

$S_u$  = Anteil des ungespaltenen am eingesetzten Substrat zum Zeitpunkt  $t$

$P_t$  = Produktanteil zum Zeitpunkt  $t$

$k_{cat}/k_M$  = Reaktionsparameter nach Heidenreich & Eckstein (1992)

$t$  = Reaktionszeit [s]

$c_{Rz}$  = Ribozymkonzentration [M]

Die Gültigkeit ist auf einen Bereich beschränkt, bei dem bei steigender Ribozymkonzentration auch eine Zunahme der Spaltprodukte zu verzeichnen ist. Der Parameter  $k_{cat}/k_M$  ist nach Umstellung der Heidenreich'schen Formel wie folgt definiert:

$$\frac{k_{cat}}{k_M} = \frac{-\ln S_u}{t \cdot c_{Rz}}$$

Der Parameter  $k_{cat}/k_M$  entspricht dem Anstieg im angenommenen linearen Teils des  $-\ln S_u/t = f(c_{Rz})$ -Diagramms.

Eine weitere Berechnungsmöglichkeit (Hendry *et al.*, 1995) berücksichtigt, daß die Reaktion nicht bis zum vollständigen Abbau des Substrates fortschreitet, sondern in der Praxis einen Maximalwert an gespaltenem Substrat bzw. entstandenem Produkt annimmt. Daher kann man den folgenden Zusammenhang definieren:

$$S_{\max} = (P_{\infty} - P_t) / P_{\Delta} = e^{-t \cdot c_{Rz} \cdot \frac{k_{cat}}{k_M}} \quad 0 \leq S_{\max} \leq S_u$$

$S_{\max}$  = Anteil des ungespaltenen am maximal spaltbaren Substrat zum Zeitpunkt  $t$

$P_t$  = Produktanteil zum Zeitpunkt  $t$

$P_{\infty}$  = Produkt zum Zeitpunkt  $t=\infty$

$P_{\Delta}$  = Differenz zwischen dem Prozentsatz des Produktes bei  $t=\infty$  und  $t=0$

$k_{cat}/k_M$  = Reaktionsparameter nach Hendry *et al.* (1995)

$t$  = Reaktionszeit [s]

$c_{Rz}$  = Ribozymkonzentration [M]

Auch diese Formel ist in dem Bereich definiert, in dem bei steigender Ribozymkonzentration auch eine Zunahme der Spaltprodukte zu verzeichnen ist. Für den Parameter  $k_{cat}/k_M$  nach Hendry *et al.* (1995) ergibt sich nach Umformung der folgende Zusammenhang:

$$\frac{k_{cat}}{k_M} = \frac{-\ln S_{max}}{t \cdot c_{Rz}}$$

Der Parameter  $k_{cat}/k_M$  nach Hendry *et al.* (1995) entspricht dem Anstieg des angenommenen linearen Abschnitts des Graphen im  $-\ln S_{max}/t = f(c_{Rz})$ -Diagramm.

Der kinetische Parameter  $k_{obs}$  beschreibt den beobachteten Stoffumsatz für die Gesamtreaktion aus Assoziation des Ribozyms mit seinem Zielmolekül und der Spaltung selbst. Er wurde nach seiner Definition (Heidenreich *et al.*, 1994) aus der zeitabhängigen Kinetik ermittelt:

$$k_{obs} = -\frac{\ln S_u}{t}$$

$k_{obs}$  = Konstante für die beobachtete Spaltung nach Heidenreich *et al.* (1994)

$S_u$  = Anteil des ungespaltenen am eingesetzten Substrat zum Zeitpunkt  $t$

$t$  = Reaktionszeit [s]

Der Parameter  $k_{obs}$  nach Heidenreich *et al.* (1994) entspricht dem Anstieg des angenommenen linearen Abschnitts des Graphen im  $-\ln S_u = f(t)$ -Diagramm. Analog zu den Berechnungen von  $k_{cat}/k_M$  wurde berücksichtigt, daß die Reaktion nicht bis zum vollständigen Abbau des Substrates fortschreitet und  $k_{obs}$  nach Hendry *et al.* (1995) berechnet:

$$P_t = P_{\infty} - e^{-k_{obs} \cdot t} \cdot P_{\Delta}$$

$k_{obs}$  = Konstante für die beobachtete Spaltung nach Hendry *et al.* (1995)

$P_t$  = Produkt zum Zeitpunkt  $t$

$P_{\infty}$  = Produkt zum Zeitpunkt  $t=\infty$

$P_{\Delta}$  = Differenz zwischen dem Prozentsatz des Produktes bei  $t=\infty$  und  $t=0$

$t$  = Reaktionszeit [s]

Nach Umformung ergibt sich:

$$k_{obs} = -\frac{\ln((P_{\infty} - P_t) / P_{\Delta})}{t}$$

Der Parameter  $k_{obs}$  nach Hendry *et al.* (1995) entspricht dem Anstieg des angenommenen linearen Abschnitts des Graphen im  $-\ln((P_{\infty}-P_t)/P_{\Delta}) = f(t)$ -Diagramm.

### 2.2.28 Präparation von Membranproteinen

Eukaryotische Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 8 cm ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Die Schalen wurden auf Eis gestellt, je 3 ml Hypolyse-Puffer zugegeben, kurz geschwenkt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abgeschabt, die Suspension in einen Homogenisator überführt und durch 10-12maliges Hochziehen und Runterdrücken des Pistills geschert. Die Suspension wurde in 15 ml-Röhrchen überführt und 10 min bei 4 °C und 2200 rpm (Zentrifuge: GS-6KR, Beckman-Coulter, 1100 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugen-Röhrchen gegeben und 30 min bei 4 °C und 60 000 rpm (Zentrifuge: Optima<sup>TM</sup> TL, Beckman-Coulter, 153 000 x g) zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer geeigneten Menge 4 x Proben-Puffer (50-200 µl) resuspendiert, 10 min bei 95 °C inkubiert und erneut 5 min bei 14 000 rpm und 4°C und zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

#### 10 x PBS

NaCl	1,37 M	Der Puffer wurde vor Gebrauch autoklaviert. Der pH-Wert 7,3 ergibt sich aus der Zusammensetzung der Lösung.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	43 mM	
KCl	27 mM	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14 mM	

### Hypolyse-Puffer

1 Cocktail-Tablette mit Proteinase-Inhibitoren (Roche) wird in 2 ml *A. bidest.* vollständig aufgelöst. Diese 2 ml werden zu 48 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) gegeben. Die Lösung ist ca. 2 Wochen bei 4 °C lagerbar.

### 4 x Proben-Puffer

1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,2 ml
150 mM DTT	247 mg
20 % SDS	2 ml
Glyzerin	2 ml
Bromphenolblau, gesättigt in 0,1 % Ethanol	1-2 Tropfen

### **2.2.29 Bestimmung von Protein-Konzentrationen**

In 2 ml Reaktionsgefäßen wurde je 1 ml Elutionslösung für Protein-Färbung vorgelegt. Auf einer Nitrozellulosemembran wurden nebeneinander 2 µl-Tröpfchen von den zu bestimmenden Proteinlösungen gesetzt (Doppelbestimmung). Außerdem wurde - ebenfalls als Doppelbestimmung - BSA in 1 x PBS (Kap. 2.2.28) in bekannter Proteinkonzentration als Eichreihe mitgeführt. Die Membran wurde für 60-90 s mit einer Amidoschwarzlösung gefärbt. Nach Abkippen der Färbelösung wurde die Membran mittels Entfärber-Lösung so lange entfärbt, bis die Nitrozellulosemembran des Hintergrundes wieder fast weiß war. Die Protein-Punkte waren nun blau. Mit einem Skalpell wurden die Punkte samt Hintergrund in annähernd gleich großen Quadraten ausgeschnitten und in die vorbereiteten Reaktionsgefäße mit der Elutionslösung gegeben. Für den Referenzwert wurde ein Quadrat mit Hintergrund ausgeschnitten. Die Reaktionsgefäße wurden ca. 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Dabei ging die Blaufärbung auf den Elutionspuffer über. Diese gefärbte Lösung wird in Einmal-Küvetten gegeben. Unter Nutzung des Spektrophotometers (Pharmacia) und dem Programm VWSS (Pharmacia) wurde der Referenzwert Null gesetzt und die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 630 nm bestimmt. Nach Auftragen der Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.



Elutionslösung

Ethanol	50 ml	50 % (v/v)
0,5 M EDTA, pH 8,0	10 µl	500 µM
0,5 M NaOH	5 ml	25 mM
<i>A. bidest.</i>	45 ml	auf 100 ml

Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz	0,1 % (w/v)
Methanol	45 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
in <i>A. bidest.</i>	

Entfärber-Lösung

Methanol	45 % (v/v)
Essigsäure	1 % (v/v)
in <i>A. bidest.</i>	

**2.2.30 Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Proteinen**

30 µg Membranproteine wurden mit 2 x Probenpuffer (Kap. 2.2.28) auf 15 µl eingestellt und 5-10 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden 1 min bei 14 000 rpm (Zentrifuge: 5415C, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand aufgetragen. Die Auftrennung der Membranproteine erfolgte mittels PAGE in 1 x Laufpuffer zunächst 30 min bei 65 V, danach für weitere 1,5 bis 2 h bei 95 V.

7,5 %iges Trenngel

<i>A. bidest.</i>	8,4 ml	Nach dem Gießen wurde das Trenngel bis zum vollständigen Polymerisieren mit Isopropanol überschichtet.
1 M Tris-HCl, pH 8,8	7,5 ml	
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %ig)	3,75 ml	
SDS (10 %ig)	200 µl	
APS (10 %ig)	150 µ	
TEMED	15 µ	

Sammelgel

<i>A. bidest.</i>	6,4 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %ig)	1,0 ml
SDS (10 %ig)	100 µl
APS (10 %ig)	75 µl
TEMED	15 µl

10 x Laufpuffer

Tris-Base	30 g
Glyzin	144 g
SDS	10 g
<i>A. bidest.</i>	auf 1 l

**2.2.31 Western-Blot**

Nach der PAGE für Proteine wurden das Sammelgel abgetrennt. Trenngel, Zellulosenitrat-Membran und 6 Lagen Whatman-Papier gleicher Größe wurden in 1 x Transfer-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in einer Semi-dry-Blotapparatur (Biometra), wobei die *sandwich*-artige Übereinanderschichtung von Whatman-Papier, Membran und Gel nach den Angaben des Herstellers ausgeführt wurde, bei 3 mA/cm<sup>2</sup> Blotfläche für 90 min.

1 x Transferpuffer

Tris-Base	3,03 g	25 mM
Glyzin	14,4 g	192 mM
Methanol	200 ml	20 %
<i>A. bidest.</i>	auf 1 l	

**2.2.32 Antikörper-Reaktion und Detektion mittels Chemolumineszenz**

Nachdem die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose-Membranen transferiert wurden, schloß sich der Nachweis von Proteinen an, die sich auf diesen Membranen befanden. Das MRP2-Protein wurde gleichzeitig mit Aktin (Kontrolle der

Beladung) nachgewiesen. Dazu wurden die primären Antikörper gegen MRP2, Klon M<sub>2</sub>I-4 (Sanbio), 1:100 und X-Actin, Klon C4 (Chemicon) 1:4000 in 1 % Magermilchpulver in 0,05 % TBST eingesetzt und ca. 1 ½ h bei Raumtemperatur unter Schwenken (Schwenker: WT16, Stufe 6) inkubiert. Die Membran wurde viermal in 0,05 % TBST innerhalb von 30 min gewaschen (Schüttler: KL2, 420 rpm). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Anti-Maus, mit POD-Markierung (Dianova) in einer Verdünnung von 1:10 000 in 0,05 % TBST für ca. 1 h unter Schwenken (Schwenker: Stufe 6). Es wurde erneut viermal in 0,05 % TBST innerhalb von 30 min gewaschen (Schüttler: KL2, 420 rpm). Die Detektion erfolgte mittels ECL<sup>TM</sup>-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) nach den Angaben des Herstellers. Die Exposition der Blots erfolgte 5-15 min auf Hyperfilm ECL (Amersham).

#### 0,05% TBST

Tris-Base	4,50 g
Tris-HCl	34,25 g
NaCl	43,90 g
Tween <sup>®</sup> 20	2,5 ml
<i>A. bidest.</i>	auf 5 l

#### **2.2.33 Proliferationsassay mittels SRB**

Der Zellproliferationsassay basierend auf einer Färbung mittels SRB bietet eine Möglichkeit, behandelte und unbehandelte Zellen hinsichtlich ihrer Zellzahl zu vergleichen, die mit der gefärbten Proteinmenge korreliert (Perez *et al.*, 1993).

Es wurden auf einer 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte 3 x 10 Kavitäten pro Testreihe mit je 800 Zellen/Vertiefung in je 100 µl modifiziertem L-15-Medium ausgesät. Auf diese Weise konnten zwei Tests pro Platte durchgeführt werden. Der verbleibende Rand wurde als Verdunstungsschutz mit je 200 µl sterilem 1 x PBS belegt (Kap. 2.2.28). Nach 24 h wurden 100 µl zytostatikahaltiges Medium zugegeben und die Zellen für weitere 5 Tage kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 % Trichloressigsäure 1 h bei 4 °C fixiert. Der Zellrasen wurde 5 x mit Wasser gewaschen und eine Proteinfärbung für 10 min mittels SRB-Färbelösung (100 µl/Kavität) durchgeführt. Die Färbelösung wurde mittels fünfmaliger Waschungen mit 1 %iger Essigsäure entfernt und die Mikrotiterplatten

getrocknet. Die vorhandenen Protein-SRB-Komplexe wurden in 300 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 gelöst. Die Intensität der Färbung wurde durch photometrische Messung mit dem Plattenlesegerät EL340 (BioTek) bei 562,5 nm gegen 690 nm Referenzwellenlänge bestimmt. Die Werte der unbehandelten Zellen wurden auf 100 % gesetzt und aus der Meßreihe die IC<sub>50</sub> bestimmt.

#### SRB-Färbelösung

Sulforhodamin B                      0,4 % (w/v)

Essigsäure                              0,1 % (v/v)

in *A. bidest.*

#### **2.2.34 Glutathion-Assay**

Eukaryotische Zellen wurden in Kulturschalen mit 3,5 cm Durchmesser ausgesät (Dreifachbestimmung) und bis zu 80 % Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden trypsiniert und 1:1 mit Medium versetzt, um das Trypsin zu inhibieren. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 950 rpm 5 min pelletiert (Zentrifuge: GS-6KR, Beckman-Coulter, 200 x g) und in 100 µl 6 %iger Trichloressigsäure resuspendiert. Durch starkes Vortexen wurden die Zellen aufgeschlossen, die Zelltrümmer 4 min bei 12 000 rpm (Zentrifuge: 5415C, Eppendorf) abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit diesem Zelllysate wurde die zweistufige Glutathionbestimmung (modifiziert, Tietze, 1969) durchgeführt. Durch Mitführung von Standardreihen für GSH und GSSG konnten die Glutathionmengen in den Lysaten quantifiziert werden.

#### Bestimmung von reduziertem Glutathion (GSH)

40 µl Zelllysate wurden in eine 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte pipettiert, 80 µl Ellman's Puffer (0,3 M Dinatriumhydrogenphosphat in *A. bidest.*) und 10 µl Ellman's Reagenz (0,04 % (w/v) 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoe)-säure in 0,1 % (w/v) Trinatriumzitat, in *A. bidest.*) zugegeben. Die Platte wurde kurz geschüttelt und sofort im Plattenlesegerät EL 340 bei 405 nm gegen 690 nm Referenzwellenlänge gemessen.

### Bestimmung von Gesamt-Glutathion (GSH und GSSG)

40 µl Zelllysate wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 300 µl Ether gewaschen, um lipide Elemente zu entfernen. Die Proben wurden 15 min im Vakuum getrocknet, um den verbleibenden Ether zu entfernen. 40 µl frisch angesetztes Natriumborhydrid (20 mg/ml in *A. bidest.*) wurden zugegeben und durch 40-minütige Inkubation bei 37 °C oxidiertes Glutathion (GSSG) in reduziertes (GSH) überführt. Das überschüssige Natriumborhydrid wurde durch langsame Zugabe von 37,5 µl 1 M HCl gelöscht. Danach wurden 40 µl Azeton und 30 µl 1 M Tris-HCl, pH 8,5 zugegeben und gemischt. 150 µl wurden auf eine 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte aufgetragen, 80 µl Ellman's Puffer und 10 µl Ellman's Reagenz (siehe Bestimmung von GSH) zugegeben, kurz geschüttelt und im Plattenlesegerät EL 340 bei 405 nm gegen 690 nm Referenzwellenlänge gemessen.

#### **2.2.35 Caspase-3-Assay**

Eukaryotische Zellen wurden in Zellkulturgefäßen mit 75 cm<sup>2</sup> Kulturfläche ausgesät (Doppelbestimmung) und bei ca. 60 % Konfluenz für 24 h mit Cisplatin (0, 25 oder 100 µM) behandelt. Die Zellen wurden trypsinisiert und 1:1 mit modifiziertem L-15-Medium versetzt. Die Zellzahl wurde bestimmt, 2 x 10<sup>6</sup> Zellen abgenommen, pelletiert, mit eiskaltem 1 x PBS (Kap. 2.2.28) gewaschen und erneut pelletiert (Zentrifuge: GS-6KR, Beckman-Coulter, 200 x g). Für die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurde der Caspase 3 Activity Assay (Roche) verwendet und die Prozedur nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden im Plattenlesegerät SPECTRA-FLUOR (Tecan) mit einem Excitation-Filter von 405 nm und einem Emission-Filter von 535 nm gemessen. Anhand der mitgeführten Standardreihe für den Fluoreszenzfarbstoff AFC konnte die Caspase-3-Aktivität quantifiziert werden.

#### **2.2.36 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflußzytometrie**

Eukaryotische Zellen wurden in Zellkulturgefäßen mit 3,5 cm Durchmesser ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 60 % mit Cisplatin (0, 25 oder 100 µM) für 2 bis 72 h behandelt. Die Zellen wurden trypsinisiert, mit eiskaltem 1 x PBS (Kap. 2.2.28) gewaschen, pelletiert (Zentrifuge: 5415C, Eppendorf, 3000 rpm) und in 1 ml 70 %igem Ethanol aufgenommen. Bis zum Tag der Messung wurden die Zellen bei 4 °C aufbewahrt. Vor der Messung wurden die

Zellen pelletiert (Zentrifuge: 5415C, Eppendorf, 3000 rpm), in 1 ml Lösung A aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es wurde erneut zentrifugiert und die Zellen in 0,5 ml Lösung B aufgenommen. 5 000 oder 10 000 Zellen wurden im FACScan (BD) im Fluoreszenzkanal FL-2 gemessen und über die Software Cellquest ausgewertet.

#### Lösung A

TritonX-100	0,1 % (v/v)
BSA (Fraktion V)	0,5 % (w/v)
RNase, DNase-frei	5 µg/ml

in *A. bidest.*

#### Lösung B

TritonX-100	0,1 % (v/v)
BSA (Fraktion V)	0,5 % (v/v)
Propidiumiodid	5 µg/ml

in *A. bidest.*

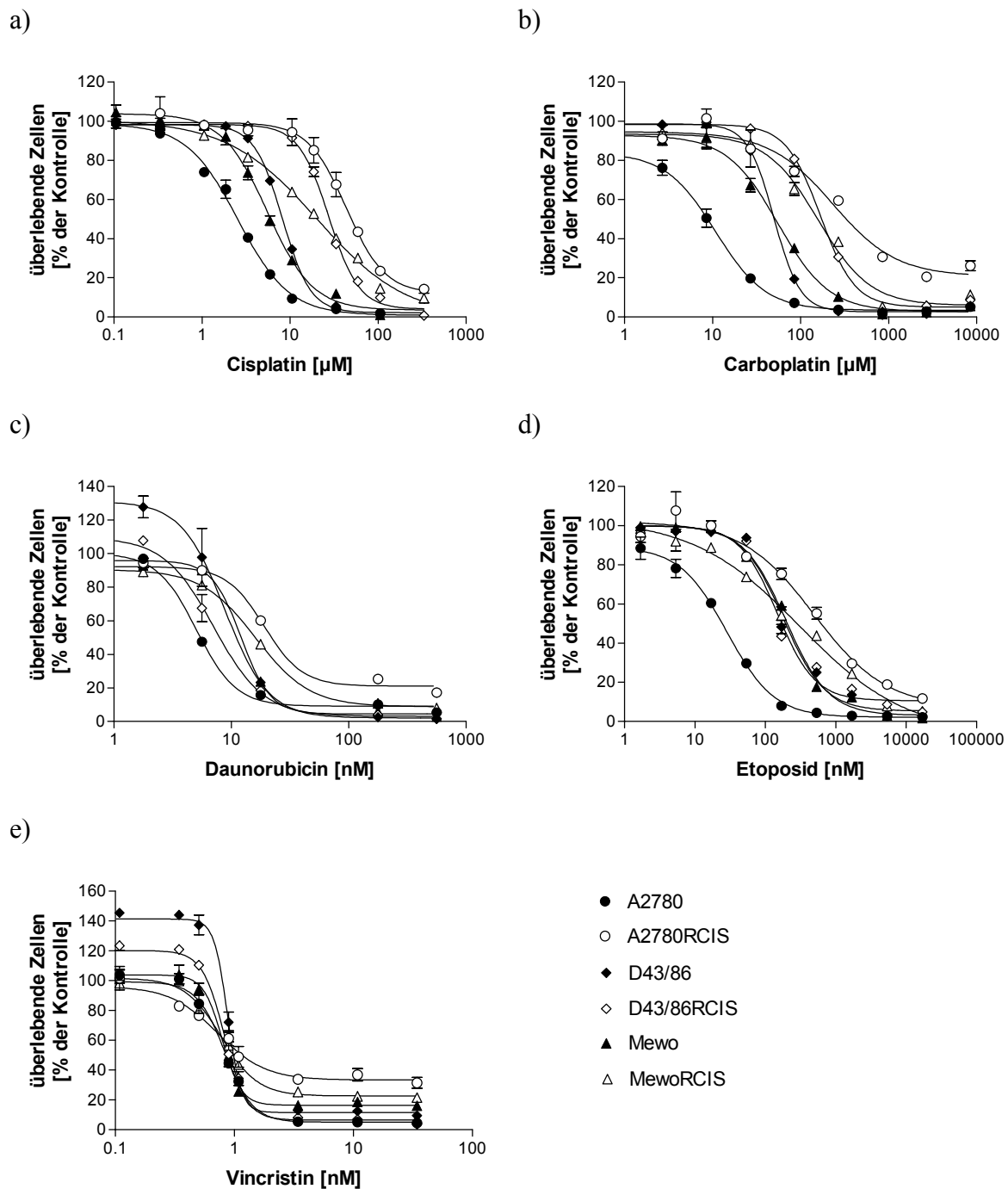
---

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Charakterisierung der Zelllinien und ihrer cisplatinresistenten Varianten**

##### **3.1.1 Wachstumsverhalten der Zelllinien unter Zytostatikabehandlung**

Um einen generellen Mechanismus für die Cisplatinresistenz zu finden, wurden drei verschiedene humane Karzinomzelllinien und ihre jeweiligen cisplatinresistenten Varianten ausgewählt. Es handelte sich um die Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und A2780RCIS, die Nebennierenrindenzellkarzinomzelllinien D43/86 und D43/86RCIS, sowie die Melanomzelllinien Mewo und MewoRCIS. Unter Nutzung eines Zellproliferationsassays (Kap. 2.2.33) wurde das Ausmaß der Resistenz durch Ermittlung der  $IC_{50}$  bestimmt. Die  $IC_{50}$  gibt die Konzentration des Zytostatikums an, bei welcher nur noch die Hälfte aller Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Untersuchungsgefäß vorliegt. Es wurden  $IC_{50}$ -Bestimmungen für die Zytostatika Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Vincristin und Etoposid durchgeführt (Abb. 3.1 und Tab. 3.1). Alle drei cisplatinresistenten Varianten waren kreuzresistent gegenüber Carboplatin. Die höchsten Resistenzfaktoren ( $R_f$ ) im Vergleich zur Ausgangszelllinie wies die Zelllinie A2780RCIS mit einem  $R_f$  von 16,8 gegenüber Cisplatin und  $R_f$  von 21,6 gegenüber Carboplatin auf. Die Zelllinie A2780RCIS war ebenfalls resistenter gegenüber Daunorubicin und Etoposid. Die Zelllinie D43/86RCIS zeigte gegenüber diesen beiden Zytostatika jedoch keine Kreuzresistenz. In der Zelllinie MewoRCIS wurde eine geringe Resistenzerhöhung gegenüber Daunorubicin und Etoposid festgestellt. In keinem der drei untersuchten Zelllinienpaare wurde eine Kreuzresistenz gegenüber Vincristin beobachtet.



**Abb. 3.1: Sensitivität der untersuchten Zelllinien gegenüber Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Etoposid und Vincristin**

Alle Zellen wurden kontinuierlich 5 Tage in zytostatikahaltigen Medien unterschiedlicher Konzentration kultiviert. Die am Ende der Inkubationszeit vorhandene Zellmenge wurde durch Färbung der membranständigen Proteine mittels SRB photometrisch bestimmt (Kap. 2.2.33). Die Menge der zytostatikafrei inkubierten Zellen wurde 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung einer repräsentativen Dreifachbestimmung. a) Cisplatin; b) Carboplatin; c) Daunorubicin; d) Etoposid; e) Vincristin.



**Tab. 3.1: IC<sub>50</sub>-Werte für Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Vincristin und Etoposid der untersuchten Zelllinien.**

Zelllinie	IC <sub>50</sub> – (Rf)				
	Cisplatin	Carboplatin	Daunorubicin	Vincristin	Etoposid
	[μM]	[μM]	[nM]	[pM]	[nM]
A2780	2,6 (1,0)	10,8 (1,0)	5,0 (1,0)	832 (1,0)	28,5 (1,0)
A2780RCIS	43,7 (16,8),***	233,0 (21,6),***	19,1 (3,8),***	724 (0,9), n.s.	493,5 (17,3),***
D43/86	8,2 (1,0)	49,8 (1,0)	8,8 (1,0)	877 (1,0)	179,5 (1,0)
D43/86RCIS	27,6 (3,4),***	168,1 (3,4),***	7,1 (0,8), n.s.	825 (0,9), n.s.	147,4 (0,8), n.s.
Mewo	5,5 (1,0)	55,3 (1,0)	12,1 (1,0)	793 (1,0)	195,7 (1,0)
MewoRCIS	20,3 (3,7),***	158,4 (2,9),***	16,2 (1,3),**	778 (1,0), n.s.	313,9 (1,6), *

Die angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch nichtlineare Regression mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf unter Nutzung des Programms GraphPad PRISM ermittelt. In Klammern ist der Resistenzfaktor Rf relativ zu der jeweiligen parentalen Zelllinie angegeben. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem *Student's* T-Test, 2-seitig, überprüft (n.s. = nicht signifikant; \* = P<0,05; \*\* = P<0,01; \*\*\* = P<0,001).

### 3.1.2 Mutationsstatus von *p53* in den Zelllinien

Es sollte der *p53*-Status in den Zelllinien ermittelt werden, um den möglichen Einfluß auf die Zytostatikaresistenz in den Zelllinien abschätzen zu können. Aus den Zelllinien A2780, A2780RCIS, D43/86, D43/86RCIS, Mewo und MewoRCIS wurde Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.2.8), cDNA synthetisiert (Kap. 2.2.14) und der offene Leserahmen von *p53* mittels RT-PCR (Kap. 2.2.15) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den prokaryotischen Vektor pCR®2.1 kloniert (Kap. 2.2.18), in *E. coli* transformiert (Kap. 2.2.4 und 2.2.5), die Plasmide isoliert (Kap. 2.2.6) und mittels Restriktionsanalyse auf ein bestehendes Insert kontrolliert (Kap. 2.2.7 mit *EcoRI*). Die Plasmide mit vorhandenem Insert wurden unter Nutzung von M13-Primern sequenziert (Kap. 2.2.19).

Nach Abgleich der ermittelten Sequenz mit der Referenzsequenz für *p53* (NM\_000546.2) unter Nutzung von Standard-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) wurde die RT-PCR, Klonierung und Sequenzierung wiederholt, um die Ergebnisse zu verifizieren. Die Resultate sind in der Tab. 3.2 zusammengefaßt. Die Zelllinie A2780 besitzt Wildtyp-TP53 mit einem genetischen Polymorphismus für die Aminosäure 72. Von einem genetischen Polymorphismus spricht man, wenn eine genetische Variante mit einer Häufigkeit von mehr als 1 % (bei Heterozygotität 2 %) in der Bevölkerung auftritt. In TP53 tritt wahlweise die

Aminosäure Arginin oder Prolin auf, wobei Arginin häufiger zu finden ist. Dieser Unterschied führt zu veränderter Mobilität in der Elektrophorese (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Beschreibung zur Referenzsequenz NM\_000546.2). A2780RCIS besitzt außer diesem Polymorphismus zwei weitere Mutationen, die zu veränderten Aminosäuren in den Positionen 111 und 351 führen. Die Zelllinien D43/86 und Mewo, sowie ihre cisplatinresistenten Varianten, besitzen ebenfalls mutiertes TP53, wobei sowohl die sensitive als auch die resistente Zelllinie die gleiche Mutation aufweisen.

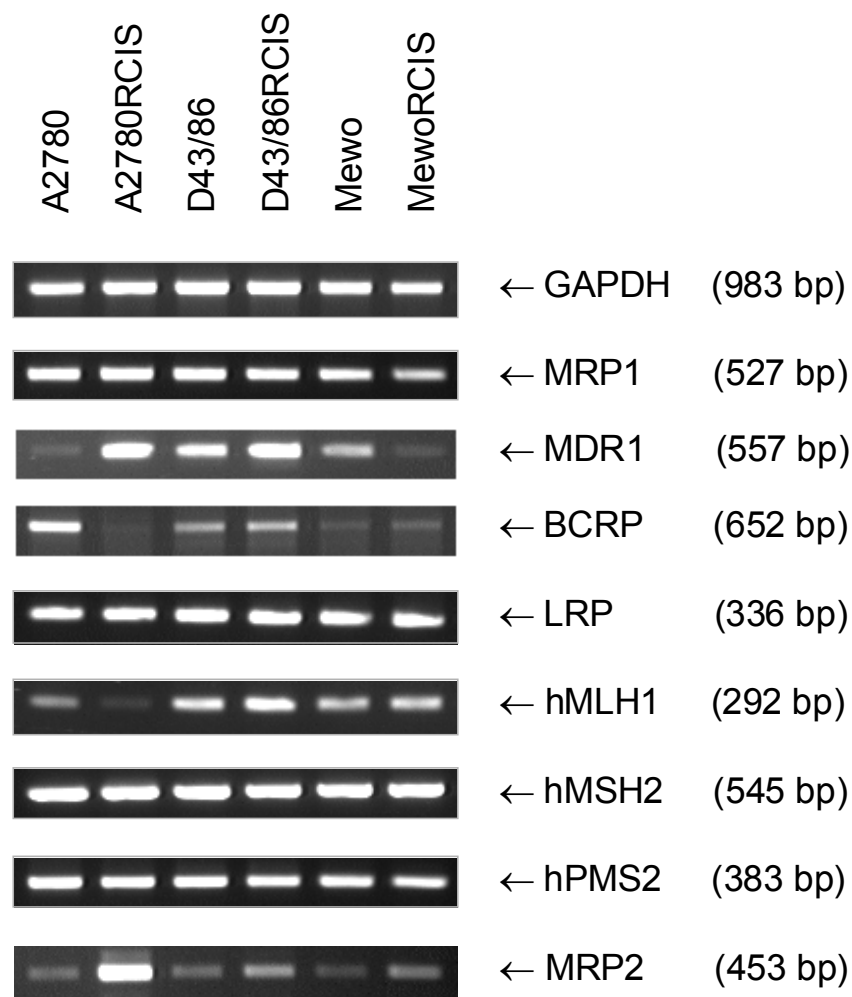
**Tab. 3.2: TP53-Status in den untersuchten Zelllinien.**

Zelllinie	Nukleotidsequenz <sup>a</sup>	Aminosäuresequenz
A2780	WT (PoM: 466 g→c, cgc→ccc)	AS 72 R→P
A2780RCIS	WT (PoM: 466 g→c, cgc→ccc)	AS 72 R→P
	583 t→a, ctg→cag	AS 111 L→Q
	1304 g→t, aag→aat	AS 351 K→N
D43/86	828 c→a, cat→aat	As 193 H→N
D43/86RCIS	828 c→a, cat→aat	AS 193 H→N
Mewo	1023 g→a, gaa→aaa	AS 258 E→K
MewoRCIS	1023 g→a, gaa→aaa	AS 258 E→K

WT=Wildtyp, AS=Aminosäure, PoM=Polymorphismus.<sup>a</sup> Die Numerierung bezieht sich auf die Referenzsequenz NM\_000546.2. Angegeben sind die Veränderungen des Nukleotids in der gegebenen Position und die daraus resultierende Veränderung des gesamten Codons.

### 3.1.3 Expression von Genen mit Relevanz für Chemoresistenz in den Zelllinien

Nachdem das Ausmaß der Resistenz in den Zelllinien A2780RCIS, D43/86RCIS und MewoRCIS im Vergleich zu ihren parentalen Ausgangslinien bekannt war, sollte im folgenden geklärt werden, wodurch sich diese Zelllinien in der Expression bestimmter Gene unterscheiden. Es wurden eine Reihe von Genen ausgewählt, von denen aus vorangegangenen Untersuchungen bekannt war, daß sie im Rahmen des Erwerbs von Chemoresistenz verändert exprimiert werden können (Kap. 1.2). Dabei sollte möglichst ein Gen gefunden werden, welches in allen drei Zelllinien gleichermaßen differenziell exprimiert wird, um einen generellen Mechanismus für Cisplatinresistenz zu finden.

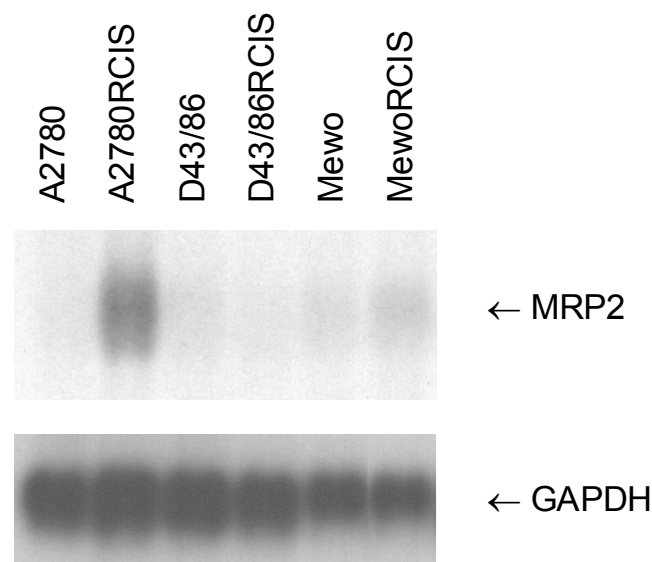


**Abb. 3.2: mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR in den untersuchten Zelllinien**

Die Zelllinien A2780, A2780RCIS, D43/86, D43/86RCIS, Mewo und MewoRCIS wurden mittels RT-PCR auf die Expression von GAPDH, MRP1, MRP2, MDR1, BCRP, LRP, hMLH1, hMLH2 und hPMS2 untersucht. Die PCR-Produkte wurden in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel aufgetrennt und durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht (Kap. 2.2.16).

Es wurde Gesamt-RNA aus den sechs Zelllinien isoliert (Kap. 2.2.8), cDNA synthetisiert (Kap. 2.2.10 und 2.2.14) und RT-PCRs (Kap. 2.2.15) für LRP, die ABC-Transporter MRP1, MRP2, MDR1 und BCRP, sowie für Komponenten des MMR-Systems (*mismatch repair system*) hMLH1, hMSH2 und hPMS2 durchgeführt. Die Gleichmäßigkeit der cDNA-Menge der verschiedenen Zelllinien wurde durch RT-PCR für das *house-keeping* Gen GAPDH kontrolliert (Abb. 3.2). Für LRP, hMSH2 und hPMS2 konnten keine Unterschiede zwischen den sechs verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. Die Expression von hMLH1 und

BCRP war in der Zelllinie A2780RCIS im Vergleich zu ihrer parentalen Linie vermindert. Dies war in den Zelllinien D43/86RCIS und MewoRCIS nicht der Fall. Die cisplatinresistente Variante MewoRCIS exprimierte etwas weniger MRP1 im Vergleich zur sensitiven Variante Mewo. In den Zelllinien A2780RCIS und D43/86RCIS war die Expression von MRP1 gegenüber ihren parentalen Zelllinien nicht verändert. Die Expression von MDR1 war in A2780RCIS und D43/86RCIS im Vergleich zu A2780 bzw. D43/86 erhöht, jedoch in der Zelllinie MewoRCIS gegenüber der sensitiven Zelllinie Mewo vermindert. Die Expression des ABC-Transporters MRP2 war in allen drei cisplatinresistenten Zelllinien im Vergleich zu ihrer jeweiligen parentalen Zelllinie erhöht, so daß dieses Gen für die weiteren Untersuchungen ausgewählt wurde.



**Abb. 3.3: Expression der MRP2-mRNA in den untersuchten Zelllinien**

Die aus den Zelllinien isolierte Gesamt-mRNA wurde in einem formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran übertragen. Eine durch PCR generierte MRP2-Sonde (453 bp) wurde radioaktiv markiert und mit der membrangebundenen MRP2-mRNA hybridisiert. Das Ausmaß der Expression konnte durch Exposition mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Zur Beladungskontrolle wurde mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert (Kap. 2.2.8 bis 2.2.13).

Dieser Unterschied konnte im Northern-Blot (Kap. 2.2.8 bis 2.2.13) für A2780RCIS und MewoRCIS bestätigt werden (Abb. 3.3). Die Länge der MRP2-mRNA im Northern-Blot betrug 5 kb. Die Expression von MRP2 in den Zelllinien D43/86 und D43/86RCIS war jedoch zu niedrig, um sie mit dieser Methode beurteilen zu können. Aus diesem Grund und um die

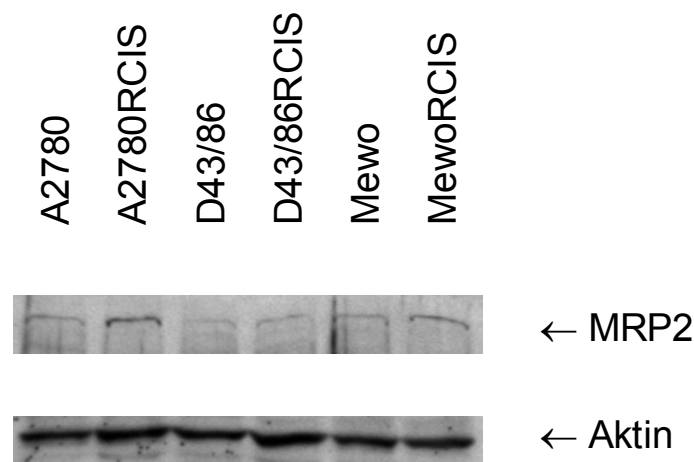
Expression von MRP2 zu quantifizieren, wurde für alle sechs Zelllinien *real-time*-RT-PCR durchgeführt (Kap. 2.2.15). Es wurde die cDNA hinsichtlich ihrer Molekülzahl für GAPDH und MRP2 analysiert und die Expression von MRP2 in den Zelllinien auf GAPDH normalisiert. Auch diese Analyse zeigte, daß in allen drei cisplatinresistenten Zelllinien MRP2 verstärkt auf mRNA-Ebene exprimiert wurde (Tab. 3.3). Der größte Unterschied ergab sich im Zelllinien-Paar A2780 zu A2780RCIS. Die MRP2-Expression in den Zelllinien D43/86 und D43/86RCIS war im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien am niedrigsten und zeigte auch den geringsten Unterschied.

**Tab. 3.3: *Real-time*-RT-PCR zur Quantifizierung der MRP2-Expression in den Zelllinien.**

Zelllinie	MRP2-mRNA-Expression <sup>a</sup> (normalisiert auf GAPDH)	Faktor der Überexpression (x-fach) <sup>b</sup>
A2780	0,0028	1,0
A2780RCIS	0,0556	19,9
D43/86	0,0022	1,0
D43/86RCIS	0,0032	1,5
Mewo	0,0043	1,0
MewoRCIS	0,0159	3,7

<sup>a</sup>Die Expression für GAPDH und MRP2 wurde in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt. Es wurde der Mittelwert gebildet und die MRP2-Expression im Verhältnis zur GAPDH-Expression ausgedrückt. <sup>b</sup>Der Faktor der Überexpression bezieht sich auf die jeweilige parentale Zelllinie.

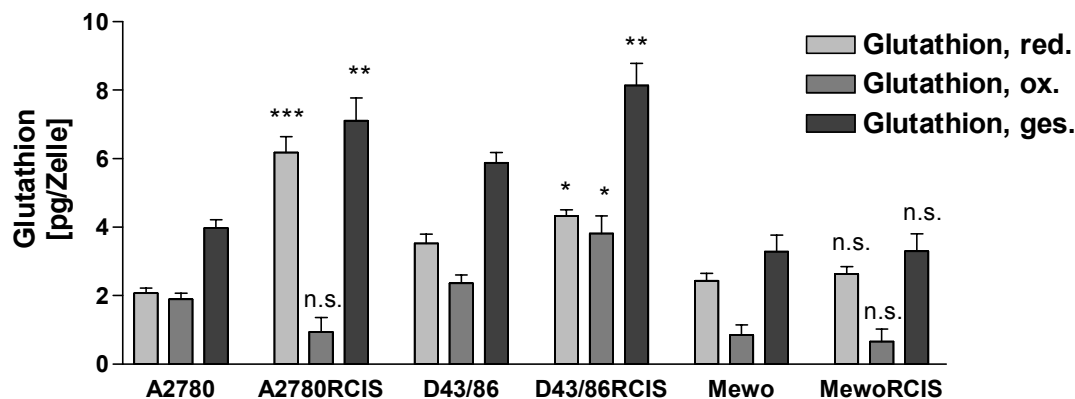
Um zu überprüfen, ob auch auf Proteinebene ein Unterschied in der MRP2-Expression besteht, wurden aus den Zelllinien Membranproteine isoliert und diese im Western-Blot mit einem MRP2-Antikörper analysiert (Kap. 2.2.28 bis 2.2.32). Auch hier bestätigte sich die erhöhte Expression von MRP2 in den cisplatinresistenten Zelllinien (Abb. 3.4), wobei die jeweiligen Unterschiede im Northern-Blot, Western-Blot und der *real-time*-RT-PCR vergleichbar waren.



**Abb. 3.4: MRP2-Protein-Expression in den untersuchten Zelllinien**

Die aus den Zelllinien isolierten Membranproteine wurden in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Nach dem Blocken wurde die Membran gleichzeitig mit Anti-MRP2-Antikörper und Anti-Aktin-Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Chemolumineszenz-System (Kap. 2.2.28 bis 2.2.32).

MRP2 gehört zu einer Reihe von ABC-Transportern, die Konjugate mit Glutathion transportieren können. In diesem Zusammenhang spielt der Gehalt von Glutathion in der Zelle, besonders der Gehalt von reduziertem Glutathion, bei Transportprozessen eine Rolle (Kap. 1.2). Um die Möglichkeiten des Transports von Zytostatika, diskutieren zu können, wurde der Glutathion-Gehalt in den Zelllinien A2780, A2780RCIS, D43/86, D43/86RCIS, Mewo und MewoRCIS bestimmt (Kap. 2.2.34). Es zeigte sich, daß die cisplatinresistenten Zelllinien A2780RCIS und D43/86RCIS einen signifikant höheren Gehalt an reduziertem Glutathion aufwiesen als die parentalen Zelllinien A2780 bzw. D43/86. Der Unterschied zwischen den Zelllinien A2780 und A2780RCIS war für reduziertem Glutathion am größten und die Zelllinie A2780 zeigte den niedrigsten Wert innerhalb der sechs untersuchten Zelllinien. Die Zelllinie D43/86RCIS zeigte außerdem einen signifikant höheren Wert für oxidiertes Glutathion. Die Zelllinien Mewo und MewoRCIS zeigten keinen Unterschied in ihrem Glutathion-Gehalt, auch nicht innerhalb der Subgruppen.



**Abb. 3.5: Glutathion-Gehalt in den untersuchten Zelllinien**

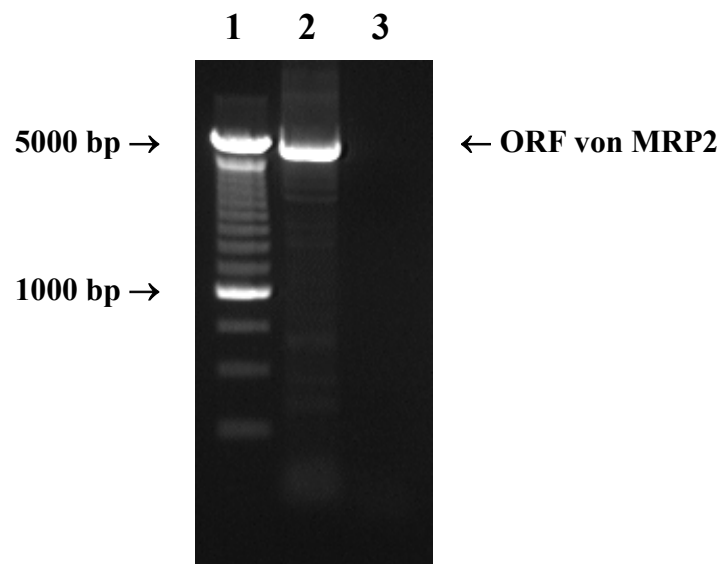
Die Zelllinien wurden ohne Zytostatikum bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert und die Zellysate auf ihren Gehalt von Glutathion mit einem photometrischen Assay untersucht (Kap. 2.2.34). Die Gehalte von reduziertem (Glutathion, red.) und Gesamt-Glutathion (Glutathion, ges.) wurden experimentell in zwei unabhängigen Meßreihen zu je drei Parallelwerten bestimmt und aus der jeweiligen Differenz der Gehalt an oxidiertem Glutathion (Glutathion, ox.) errechnet. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus allen sechs Einzelmessungen mit ihrer Standardabweichung. Die Signifikanz der Unterschiede zur jeweiligen parentalen Zelllinie wurde mit dem *Student's T-Test*, 2-seitig, überprüft (n.s. = nicht signifikant; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ).

### 3.2 Überexpression von MRP2 in der Zelllinie A2780

Nach dem Vergleich der drei verschiedenen Zelllinien und ihrer cisplatinresistenten Varianten (Kap. 3.1) wurde die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und ihre resistente Sublinie für die weiteren Untersuchungen ausgewählt, da hier sowohl das Resistenzniveau als auch die Expression von MRP2 die größten Unterschiede gezeigt hatte. Im nächsten Schritt sollte MRP2 in der sensibleren Zelllinie A2780 überexprimiert werden, um nach Analyse der entstehenden Klone, den Zusammenhang zwischen MRP2-Expression und Resistenz gegenüber Cisplatin (und eventuell weiteren Zytostatika) nachweisen zu können.

### 3.2.1 Klonierung von MRP2 aus der Zelllinie A2780RCIS

Aus der Zelllinie A2780RCIS wurde Gesamt-RNA isoliert (Kap. 2.2.8), cDNA synthetisiert (Kap. 2.2.10 und 2.2.14) und der gesamte offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) von MRP2 durch RT-PCR (Kap. 2.2.15) amplifiziert. Da der ORF mit ca. 4,6 kb sehr groß ist, wurde eine besondere Polymerase ausgewählt, die auch lange Bereiche amplifizieren kann und eine Korrekturlese-Aktivität besitzt. Trotzdem konnte erst durch PCR-Zusatzreagenzien, wie Betain und DMSO, ein PCR-Produkt erhalten werden (Abb. 3.6). Diese beiden Reagenzien bewirken eine Erhöhung der Ausbeute und der Spezifität für das gegebene PCR-Produkt.



**Abb. 3.6: Amplifikation des ORFs von MRP2 mittels RT-PCR aus A2780RCIS**

Mittels RT-PCR wurde aus der cDNA der Zelllinie A2780RCIS der ORF von MRP2 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel unter Zusatz von Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht (Kap. 2.2.8, 2.2.10, 2.2.14 und 2.2.16). 1 = DNA-Leiter, 2 = RT-PCR unter Zusatz von Betain und DMSO, 3 = RT-PCR ohne Betain und DMSO.

Der amplifizierte ORF von MRP2 wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert, der einen CMV-Promotor enthält (Kap. 2.2.18). Dieser Vektor wurde in *E. coli* vermehrt (Kap. 2.2.5), die Plasmide präpariert (Kap. 2.2.6) und durch Restriktionsanalyse mit *KpnI* das Vorhandensein und die Orientierung des Inserts überprüft (Kap. 2.2.7). Mehrere Klone wurden komplett sequenziert (Kap. 2.2.19), um nach Sequenzvergleich mit der Datenbank



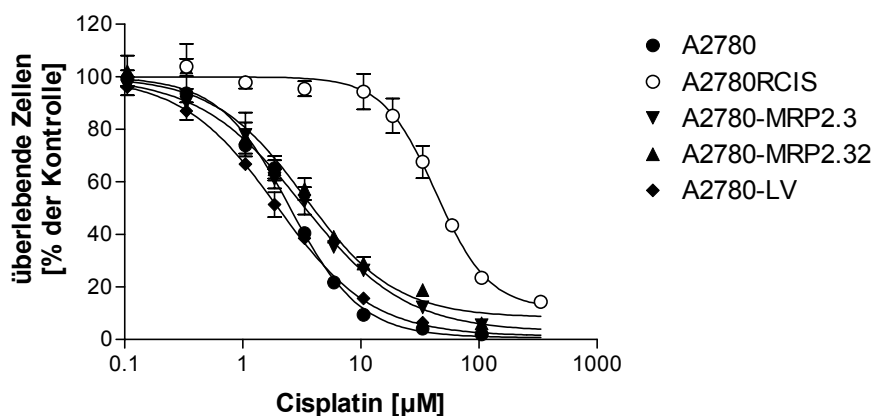
(Kap. 2.1.9) einen geeigneten Klon für die Transfektion in die Zelllinie A2780 auszuwählen. Es zeigte sich, daß MRP2 in der Zelllinie A2780RCIS, verglichen mit der Referenzsequenz NM\_000392.1, an der Nukleotidposition 2046 T→C eine Mutation besitzt, die zu einem Aminosäureaustausch an der Position 670 I→T führt.

Es wurde überprüft, ob die bereits untersuchten Zelllinien ebenfalls diese Mutation aufweisen. Der entsprechende Abschnitt von MRP2 wurde in den Zelllinien A2780, D43/86, D43/86RCIS, Mewo und MewoRCIS ebenfalls mittels RT-PCR amplifiziert (Kap. 2.2.15). Die Produkte wurden in den prokaryotischen Vektor pCR2.1<sup>®</sup> kloniert, in *E. coli* vermehrt und sequenziert. Es stellte sich heraus, daß die parentale Zelllinie A2780 diese Mutation ebenfalls aufweist, jedoch keine der anderen vier untersuchten Zelllinien.

### 3.2.2 Transfektion von MRP2 in die Ovarialkarzinomzelllinie A2780

Nachdem der ORF von MRP2 in einem eukaryotischen Expressionsvektor vorlag, wurde dieses Konstrukt in die sensitivere Zelllinie A2780 transfiziert (Kap. 2.2.3), die im Vergleich zu ihrer resistenten Variante A2780RCIS nur wenig eigenes MRP2 besitzt (Kap. 3.1.3). Zur Kontrolle des Experiments wurde parallel dazu die A2780 mit dem Expressionsvektor ohne MRP2-ORF (Leervektor, LV) transfiziert. Nach Selektion mit G418 bildeten sich in den Zellkulturschalen Klone, von denen 36 vereinzelt und propagiert wurden. Sie wurden im Proliferationsassay gegenüber Cisplatin getestet (Kap. 2.2.33). Lediglich 2 Klone zeigten eine Resistenzerhöhung gegenüber Cisplatin (Abb. 3.7) und wurden weiter untersucht.

Diese beiden Klone wurden auch auf ihre Kreuzresistenz gegenüber Carboplatin, Etoposid, Daunorubicin und Vincristin im Proliferationsassay mittels SRB getestet. Beide Klone zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber Carboplatin, die sogar höher ausfiel als gegenüber Cisplatin. Gegenüber Daunorubicin und Vincristin konnte keine veränderte Sensitivität in den MRP2-Transfektanten festgestellt werden, wobei die IC<sub>50</sub>-Werte gegenüber Vincristin bei Vergleich der untersuchten Zelllinien starken Schwankungen unterlagen. Ein Klon zeigte eine Erhöhung der Resistenz gegenüber Etoposid, der andere Klon verhielt sich ähnlich wie die Leervektor-Transfektante (Tab. 3.4).



**Abb. 3.7: Sensitivität der A2780-MRP2-Klone gegenüber Cisplatin**

Alle Zellen wurden kontinuierlich 5 Tage in cisplatinhaltigen Medien unterschiedlicher Konzentration kultiviert. Die am Ende der Inkubationszeit vorhandene Zellmenge wurde durch Färbung der membranständigen Proteine mittels SRB photometrisch bestimmt (Kap. 2.2.33). Die Menge der cisplatinfrei inkubierten Zellen wurde 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung einer repräsentativen Dreifachbestimmung. Bei den Bezeichnungen A2780-MRP2.3 und A2780-MRP2.32 handelt es sich um MRP2-Transfektanten mit ihrer Klon-Nummer und bei A2780-LV handelt es sich um eine Leervektor-Transfektante. A2780 ist die untransfizierte sensible Ausgangszelllinie und A2780RCIS die untransfizierte cisplatinresistente Variante zur parentalen Linie A2780.

**Tab. 3.4: IC<sub>50</sub>-Werte für Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Vincristin und Etoposid der A2780-MRP2-Klone.**

Zelllinie	IC <sub>50</sub> – (Rf)				
	Cisplatin [µM]	Carboplatin [µM]	Daunorubicin [nM]	Vincristin [pM]	Etoposid [nM]
A2780	2,6 (1,0),**	10,8 (1,0), n. s.	5,0 (1,0), n. s.	832 (1,0),**	28,5 (1,0),**
A2780RCIS	43,7 (16,8),***	233,0 (21,6), ***	19,1 (3,8),***	724 (0,9), n. s.	493,5 (17,3),***
A2780-MRP2, Klon 3	3,2 (1,2),** (*)	27,5 (2,5),**	5,1 (1,0), n.s.	656 (0,8), n. s. (**)	61,3 (2,2),*** (***)
A2780-MRP2, Klon 32	3,4 (1,3),** (*)	62,2 (5,8),***	5,7 (1,1), n.s.	792 (1,0),* (n. s.)	39,0 (1,4), n. s. (n. s.)
A2780-LV	2,0 (0,8)	10,0 (0,9)	5,7 (1,1)	698 (0,8)	43,0 (1,5)

Die angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch nichtlineare Regression mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf unter Nutzung des Programms GraphPad PRISM ermittelt. In Klammern ist der Resistenzfaktor Rf relativ zur parentalen Zelllinie A2780 angegeben. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem *Student's* T-Test, 2-seitig, überprüft (n.s. = nicht signifikant; \* = P<0,05; \*\* = P<0,01; \*\*\* = P<0,001) und bezieht sich auf die Leervektortransfektante A2780-LV. Für den Fall, daß sich A2780 und A2780-LV signifikant unterschieden, wurden das Signifikanzniveau im Vergleich zur Zelllinie A2780 in Klammern angegeben.

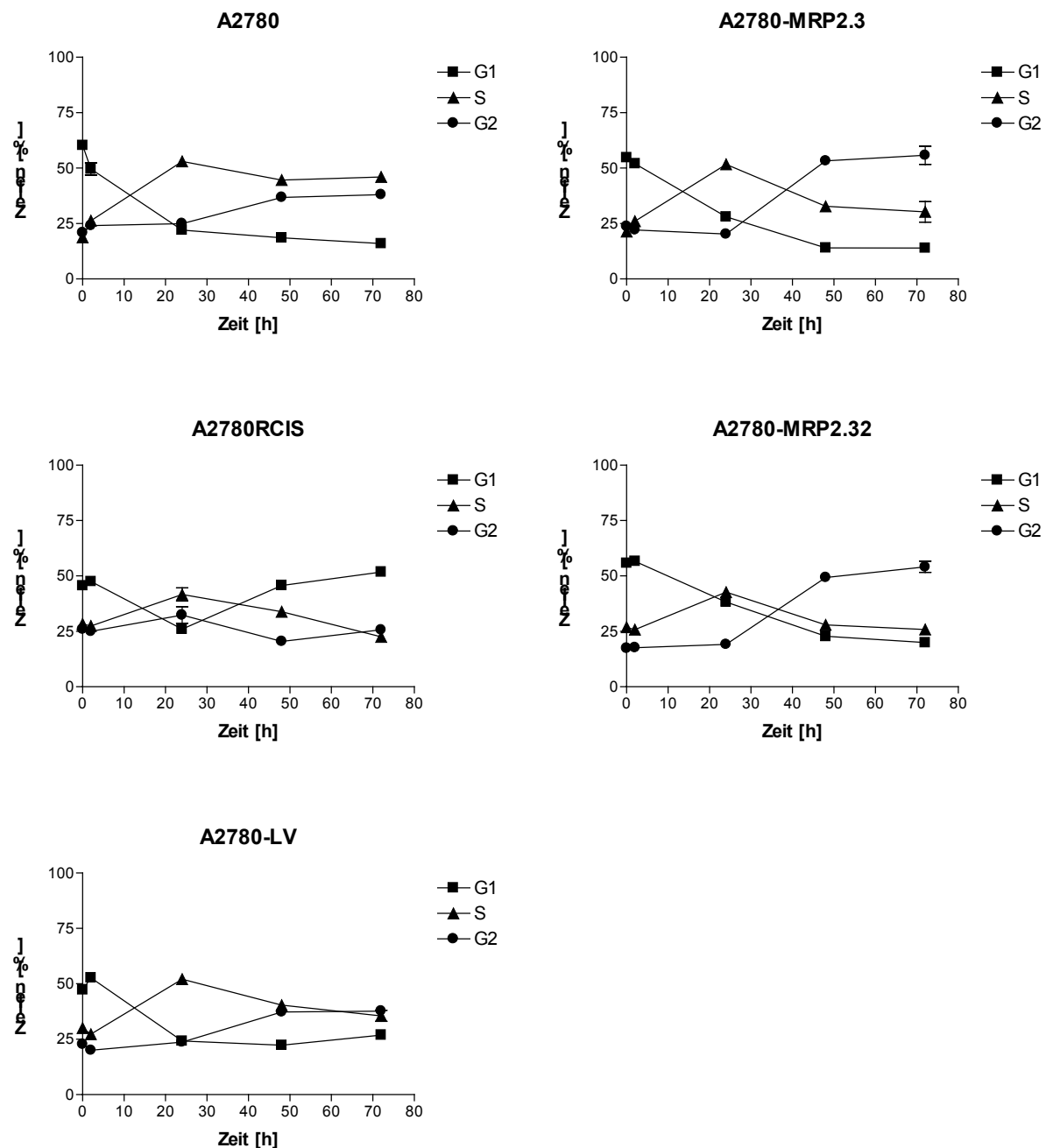
Aus den beiden MRP2-Klonen und der Leervektor-Transfektante wurde Gesamt-mRNA (Kap. 2.2.8) isoliert, cDNA synthetisiert (Kap. 2.2.10 und 2.2.14) und die Expression von MRP2 im Vergleich zu GAPDH mittels *real-time*-RT-PCR quantifiziert (Kap. 2.2.15). Die beiden Klone zeigten eine 4- bzw. 7-fache Erhöhung der MRP2-Expression im Vergleich zur untransfizierten Zelllinie A2780 (Tab. 3.5).

**Tab. 3.5: *Real-time*-RT-PCR zur Quantifizierung der MRP2-Expression in den A2780-MRP2-Klonen.**

Zelllinie	MRP2-mRNA-Expression (normalisiert auf GAPDH) <sup>a</sup>	Faktor der Überexpression (x-fach) <sup>b</sup>
A2780	0,0028	1,0
A2780RCIS	0,0556	19,9
A2780-MRP2, Klon 3	0,0117	4,2
A2780-MRP2, Klon 32	0,0197	7,0
A2780-LV	0,0027	1,0

<sup>a</sup>Die Expression für GAPDH und MRP2 wurde in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt. Es wurde der Mittelwert gebildet und die MRP2-Expression im Verhältnis zur GAPDH-Expression ausgedrückt. <sup>b</sup>Der Faktor der Überexpression bezieht sich auf die parentale Zelllinie A2780.

Es sollte untersucht werden, ob und wie sich die MRP2-Transfektanten hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Cisplatin von der Ausgangslinie A2780 unterscheiden. Die Zellen wurden mit 25 µM Cisplatin kontinuierlich über mehrere Tage behandelt und die adhären Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Nach Färbung mit Propidiumiodid und Messung der Zellen im Durchflußzytometer wurde der Anteil der Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen prozentual im Vergleich zu allen im Zellzyklus befindlichen Zellen bestimmt (Kap. 2.2.36 und Abb. 3.8). In unbehandelten Zellen befanden sich die meisten Zellen in der G1-Phase. Im zeitlichen Verlauf unter Cisplatin-Behandlung nahm in den A2780 der Anteil der Zellen in der G1-Phase ab. Die Zellen befanden sich vermehrt in der S- und der G2-Phase. Außerdem wurden sehr viele tote Zellen im Zellkulturüberstand festgestellt, die nicht in diese Untersuchung einbezogen wurden. Im Vergleich dazu reagierte die cisplatinresistente Zelllinie A2780RCIS nach 24 h mit einer verstärkten S-Phase. Danach normalisierte sich der Zellzyklus bis zum 3. Tag nach Behandlungsbeginn, obwohl das Zellkulturmedium weiterhin Cisplatin enthielt. Tote Zellen im Zellkulturüberstand wurden kaum beobachtet.

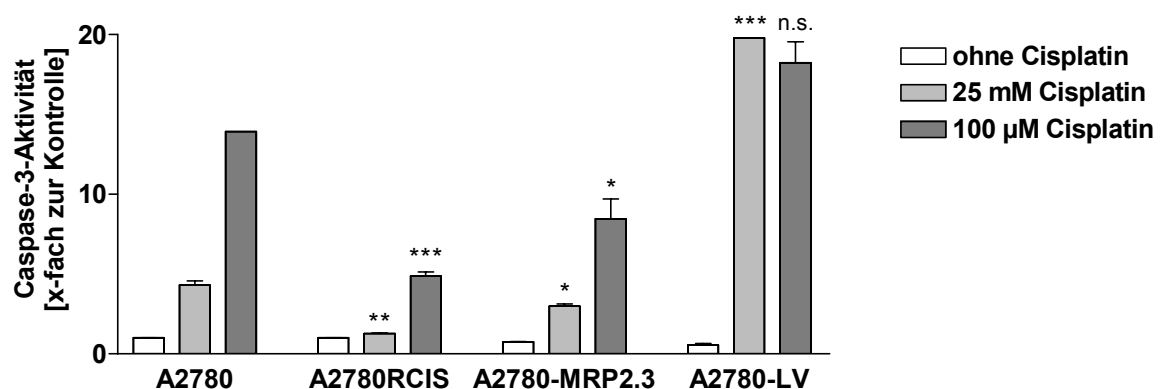


**Abb. 3.8: Zellzyklusanalysen in den A2780-MRP2-Klonen**

Die Zellen wurden kontinuierlich mit 25  $\mu$ M Cisplatin behandelt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Nach Färbung mit Propidiumiodid wurden die Zellen im Durchflußzytometer hinsichtlich ihres DNA-Gehalt vermessen und aus dem Profil der prozentuale Anteil der Zellen an den Zellzyklusphasen G1, S und G2 bestimmt (Kap. 2.2.36). Bei den Bezeichnungen A2780-MRP2.3 und A2780-MRP2.32 handelt es sich um MRP2-Transfektanten mit ihrer Klon-Nummer und bei A2780-LV handelt es sich um eine Leervektor-Transfektante. A2780 ist die untransfizierte sensible Ausgangszelllinie und A2780RCIS die untransfizierte cisplatinresistente Variante zur parentalen Linie A2780.

Die MRP2-Transfektanten zeigten unter Cisplatinbehandlung eine Verteilung der Zellzyklus-Phasen, die zwischen der für die Zelllinien A2780 und A2780RCIS lag. Die Transfektanten arretierten hauptsächlich in der G2-Phase und starben nicht so stark ab wie die Zelllinie A2780. Die Leervektor-Transfektante verhielt sich vergleichbar zur untransfizierten Zelllinie.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die MRP2-Transfektanten in bezug auf ihr Apoptoseverhalten unterscheiden. Da sich in den Zellen im Agarosegel und nach Analyse mittels Durchflußzytometrie nach Cisplatin-Behandlung keine typische DNA-Fragmentierung nachweisen ließ (Daten nicht gezeigt), die Zellen jedoch nach Cisplatin-Behandlung (je nach Dosis) abstarben, stellte sich die Frage, wie in der Zelllinie A2780 Apoptose ausgelöst wird bzw. ob sich die Klone im Ausmaß der Apoptose-Induktion unterscheiden. Die Zelllinien A2780 und A2780RCIS, sowie eine MRP2-Transfektante und eine Leervektor-Transfektante wurden mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen für 24 h behandelt und die hergestellten Zellysate auf ihre Caspase-3-Aktivität untersucht (Kap. 2.2.35).



**Abb. 3.9: Caspase-3-Aktivität nach Cisplatinbehandlung in den MRP2-Klonen.**

Die Zellen wurden 24 h mit Cisplatin behandelt. In den Zellysaten wurde die Caspase-3-Aktivität bestimmt (Kap. 2.2.35). Die Aktivitäten wurden auf die unbehandelte parentale Zelllinie A2780 normiert. Bei A2780-MRP2.3 handelt es sich um MRP2-Transfektante mit ihrer Klon-Nummer und bei A2780-LV handelt es sich um eine Leervektor-Transfektante. A2780 ist die untransfizierbare sensible Ausgangszelllinie und A2780RCIS die untransfizierbare cisplatinresistente Variante zur parentalen Linie A2780. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem *Student's T-Test*, 2-seitig, überprüft (n.s. = nicht signifikant; \* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ) und bezieht sich auf die Ausgangszelllinie A2780.

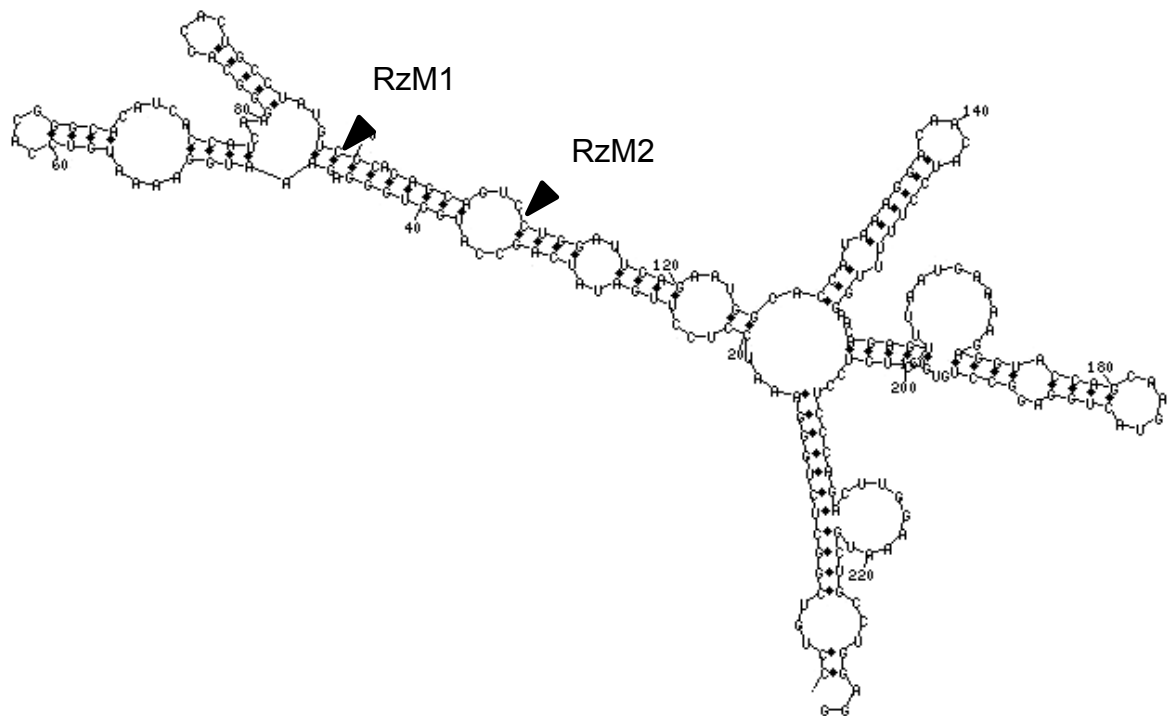
Die gefundenen Caspase-3-Aktivitäten wurden auf die geringe Grundaktivität in der Zelllinie A2780 ohne Cisplatin-Behandlung normalisiert und miteinander verglichen (Abb. 3.9). Bei steigender Cisplatin-Konzentration im Zellkulturmedium stieg die Caspase-3-Aktivität an, was auf ein vermehrtes Auslösen von apoptotischen Ereignissen schließen läßt. Die MRP2-Transfektante zeigte weniger Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur untransfizierten Ausgangslinie A2780 ( $P < 0,05$ ). Die geringste Caspase-3-Aktivität zeigte die cisplatinresistente Zelllinie A2780RCIS. Die Leervektortransfektante zeigte im Vergleich zur untransfizierten A2780 mehr Aktivität bei 25  $\mu\text{M}$ , was vermutlich auf einen klonalen Effekt zurückzuführen ist. Bei 100  $\mu\text{M}$  gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Leervektortransfektante und der Ausgangszelllinie.

### **3.3 Entwicklung und Applikation von Ribozymen gegen die MRP2-mRNA *in vitro***

#### **3.3.1 Auswahl potentieller Ribozymschnittstellen**

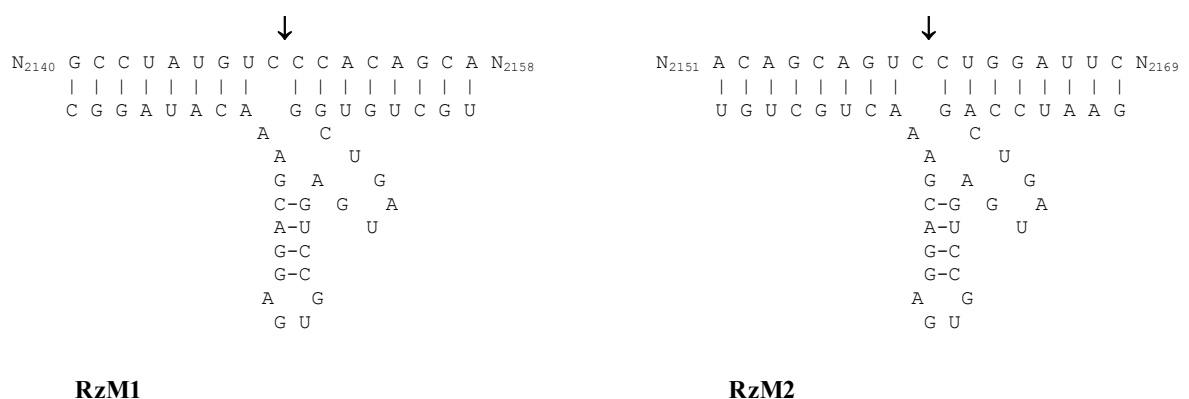
In den vorangegangenen Experimenten (Kap. 3.1 und 3.2) zeigte sich bereits ein Zusammenhang zwischen MRP2-Expression und der Resistenz gegenüber Cisplatin und Carboplatin. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Resistenz gegenüber diesen Zytostatika durch den Einsatz von Anti-MRP2- *Hammerhead*-Ribozymen verringern läßt.

Mit Hilfe der Computerprogramme DNASIS und mFOLD wurden Teilabschnitte der MRP2-mRNA auf Sekundärstruktur und die Lage der Zielsequenz 5'-GUC-3' untersucht. Als potentielle Schnittstellen wurden diejenigen GUC-Motive betrachtet, die sich in einzelsträngigen Bereichen der berechneten Sekundärstrukturen mit der niedrigsten freien Energie  $\Delta G$  befanden (Kap. 2.2.20). Die Faltungsanalysen wurden mit Nukleotidsequenzen der MRP2-mRNA von 200 bzw. 233 nt Länge durchgeführt, die im weiteren als Substrate für die *in vitro*-Untersuchungen verwendet werden sollten (Abb. 3.10). Für die folgenden Untersuchungen wurden Schnittstellen für zwei Anti-MRP2-Ribozyme, RzM1 und RzM2, ausgewählt. Die Struktur der *Hammerhead*-Ribozyme mit ihren Bindungssequenzen in der MRP2-mRNA ist in Abb. 3.11 dargestellt.



**Abb. 3.10: Sekundärstruktur von einem Abschnitt der MRP2-mRNA**

Die Positionen der 5'-GUC-3'-Tripletts als Schnittstellen für die Anti-MRP2-Ribozyme RzM1 und RzM2 sind gekennzeichnet. Die Numerierung der Nukleotide bezieht sich auf die Nukleotidnummer innerhalb des Substrates 2 mit 233 nt Länge (Nukleotid: +2014 bis +2246 in der Referenzsequenz NM\_000392.1 für MRP2 bezogen auf das Startcodon).

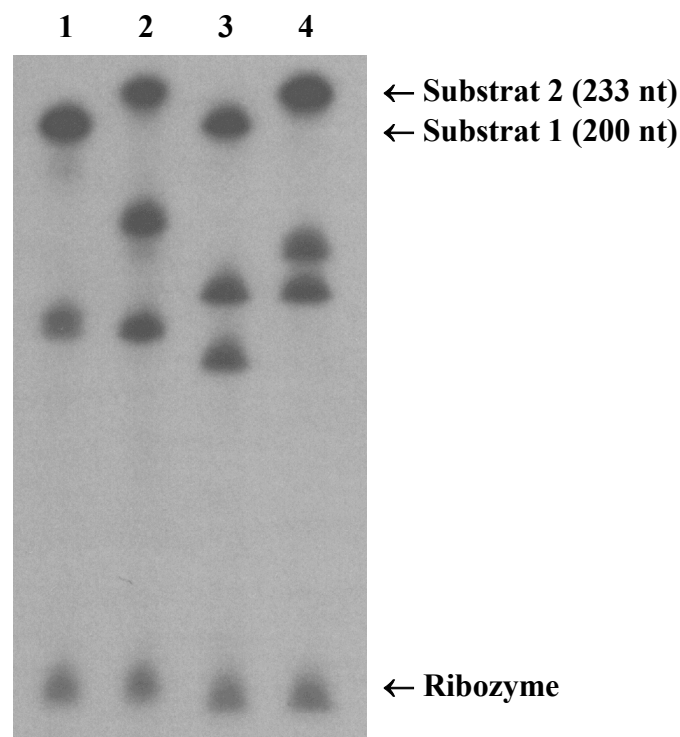


**Abb. 3.11: Sequenzen der Anti-MRP2-Hammerhead-Ribozyme RzM1 und RzM2**

Die Basenpaarinteraktionen zwischen den *Hammerhead*-Ribozymen und der MRP2-mRNA sind angegeben. Die Numerierung der Nukleotide bezieht sich auf die Referenzsequenz NM\_000392.1. Die Pfeile geben die potentiellen Schnittstellen in der mRNA an.

### 3.3.2 Ribozymatische Spaltung von Fragmenten der MRP2-mRNA durch die Ribozyme RzM1 und RzM2

Die Matrizen für die Substrate sub1 und sub2 wurden mittels PCR hergestellt (Kap. 2.2.15), die sich nur durch ihre Länge am 3'-Ende unterscheiden (200 nt bzw. 233 nt ohne T7-Promotor-Sequenz). Für die Ribozyme wurden die T7-Promotor-enthaltenden Oligonukleotide RcMAT7-fw und RcMAT7-rev (für RzM1) sowie RcMBT7-fw und RcMBT7-rev (für RzM2) hybridisiert. Die Substrate und die Ribozyme wurden *in vitro*-transkribiert, nach PAGE aus dem Gel aufgereinigt und die entstandenen Stoffmengen quantifiziert (Kap. 2.2.21 bis 2.2.25), um in den folgenden Versuchen definierte Mengen einsetzen zu können.



**Abb. 3.12: Spaltung der Substrate sub1 und sub2 durch die *Hammerhead*-Ribozyme RzM1 und RzM2**

Es wurden im *in vitro*-Schnittversuch äquimolare Mengen von radioaktiv markierter Ribozym- und Substrat-RNA eingesetzt (je 200 nM). Nach der Spaltung (2 h, 37 °C, Kap. 2.2.26) wurden die RNAs durch PAGE (Kap. 2.2.23) aufgetrennt und durch Exposition auf Röntgenfilm sichtbar gemacht. 1 = sub1 + RzM1, Spaltprodukte 99 und 101 nt; 2 = sub2 + RzM1, Spaltprodukte 99 und 134 nt; 3 = sub1 + RzM2, Spaltprodukte 110 und 90 nt; 4 = sub2 + RzM2, Spaltprodukte 110 und 123 nt.

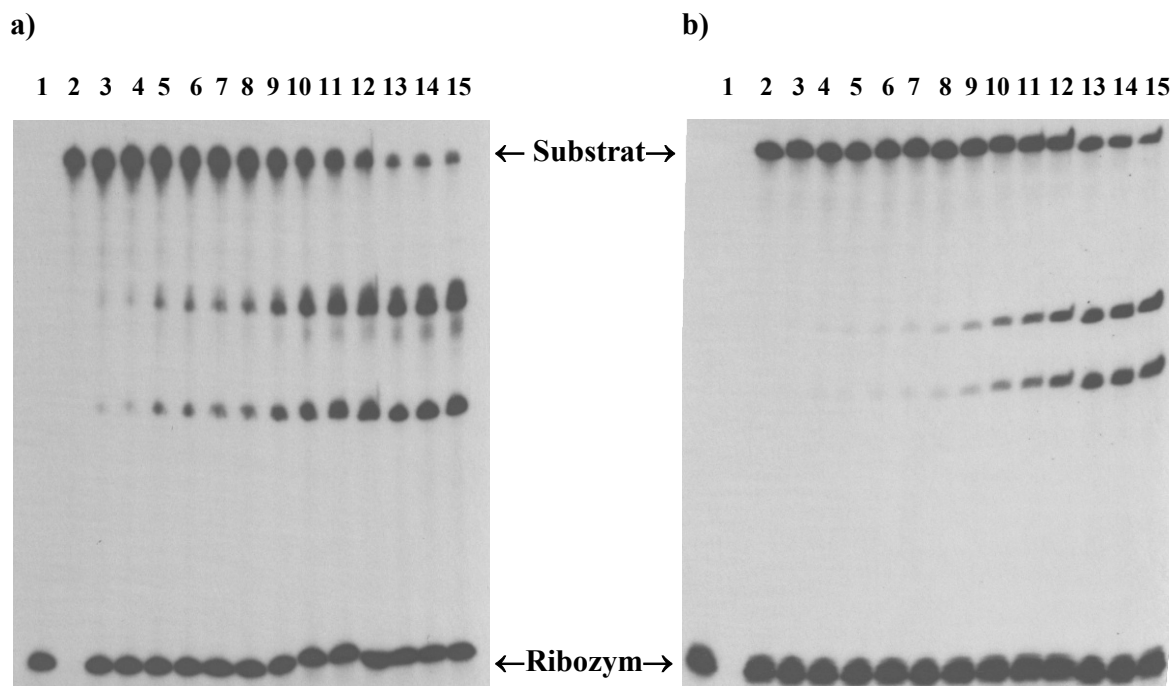


Äquimolare Mengen von einem gegebenen Substrat und jeweils einem Ribozym wurden 2 h bei 37 °C inkubiert (je 200 nM, Kap. 2.2.26). Die Spaltungseffizienzen konnten nach Auftrennung in einem Polyacrylamidgel und Exposition auf Röntgenfilm beurteilt werden (Kap. 2.2.23). Es stellte sich heraus, daß beide Ribozyme in der Lage sind, die verkürzten MRP2-mRNA-Substrate sub1 und sub2 mit guter Effizienz zu spalten (Abb. 3.12).

### 3.3.3 Charakterisierung der Ribozyme RzM1 und RzM2 *in vitro*

Um die Eigenschaften der Spaltung durch die Ribozyme RzM1 und RzM2 näher zu untersuchen und mit anderen Ribozymen aus der Fachliteratur vergleichen zu können, wurden mit Hilfe kinetischer Analysen die Initialgeschwindigkeit  $v_{ini}$ , sowie die Reaktionsparameter  $k_{cat}/k_M$  und  $k_{obs}$  (nach Heidenreich & Eckstein, 1992; Heidenreich *et al.*, 1994 und Hendry *et al.*, 1995) bestimmt. Aufgrund der besseren Unterscheidbarkeit der Spaltprodukte im Polyacrylamidgel (Abb. 3.12) wurden die Spaltversuche für RzM1 durch Inkubation mit Substrat 2 und für RzM2 durch Inkubation mit Substrat 1 durchgeführt.

Es wurde eine zeitabhängige Reaktionskinetik aufgenommen, wobei das jeweilige Ribozym in einem Überschuß in einem Verhältnis von 5:1 eingesetzt wurde (Kap. 2.2.26). Die Spaltungen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt, die Reaktionsprodukte mittels PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 3.13, Kap. 2.2.23). Die Bandenintensitäten wurden densitometrisch ausgemessen und für die Erstellung der kinetischen Kurven genutzt. Die Initialgeschwindigkeit  $v_{ini}$  wurde aus dem jeweiligen Anstieg im angenommenen linearen Anfangsbereich der Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit errechnet (Abb. 3.14, Kap. 2.2.27). Aus der Abb. 3.13 ist ersichtlich, daß auch nach fünf Stunden maximal beobachteter Reaktionszeit das Substrat nicht vollständig umgesetzt wurde und sich ein Gleichgewicht bei ca. 80 % einstellt. Dies trifft gleichermaßen auf die Ribozyme RzM1 und RzM2 zu. Die Initialgeschwindigkeit  $v_{ini}$  beträgt für Ribozym RzM1  $0,127 \pm 0,006$  fmol/s und für Ribozym RzM2  $0,086 \pm 0,005$  fmol/s (Materna *et al.*, 2001). RzM1 zeigte in diesem Vergleich mit RzM2 die höhere Initialgeschwindigkeit.

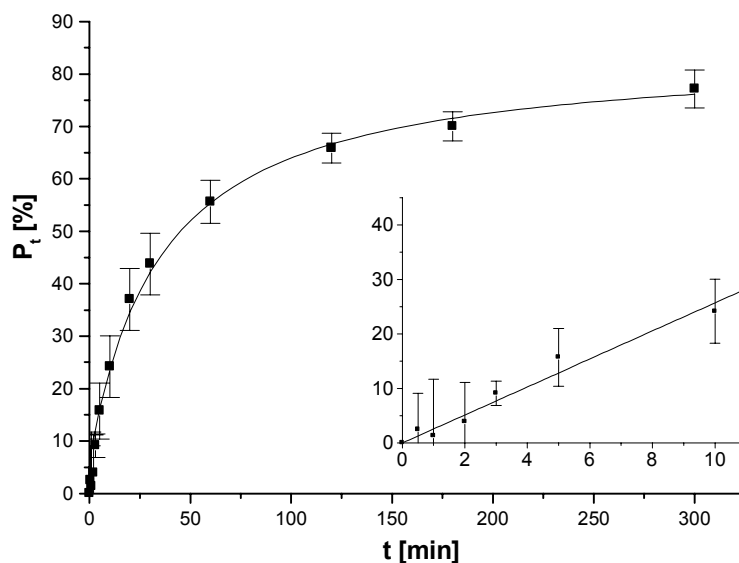


**Abb. 3.13: Zeitabhängigkeit der Spaltung durch RzM1 und RzM2**

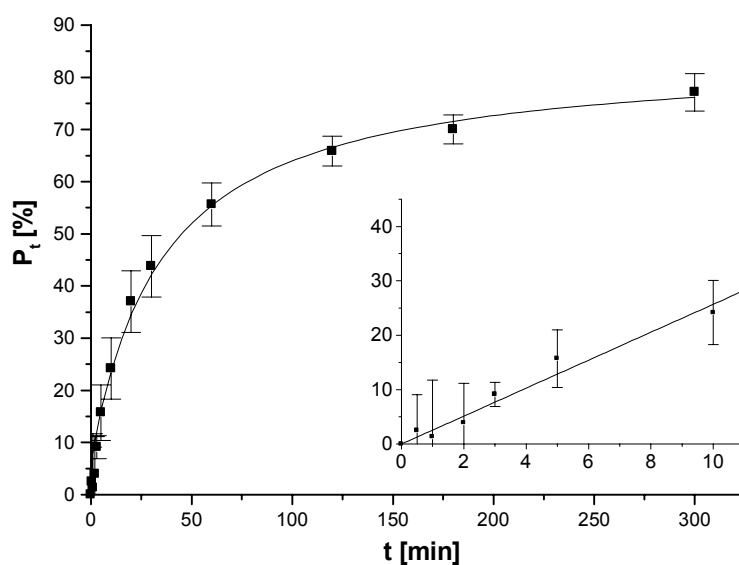
Die Ribozyme wurden mit ihren Substraten im Verhältnis 5:1 inkubiert (Kap. 2.2.26). Nach verschiedenen Zeiten wurde die Reaktion abgestoppt, die Produkte mittels PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Kap. 2.2.23). 1 = Ribozym; 2 = Substrat; 3 bis 15 = Ribozym + Substrat; 3 = 0 min; 4 = 0,5 min; 5 = 1 min; 6 = 2 min; 7 = 3 min; 8 = 5 min; 9 = 10 min; 10 = 20 min; 11 = 30 min; 12 = 60 min; 13 = 120 min; 14 = 180 min; 15 = 300 min; a) Reaktion von Ribozym RzM1 (38 nt) mit Substrat 2 (233 nt), Größe der Spaltprodukte 99 und 134 nt; b) Reaktion von Ribozym RzM2 (38 nt) mit Substrat 1 (200 nt), Größe der Spaltprodukte 110 und 90 nt.

Um die Reaktionsparameter  $k_{\text{cat}}/k_{\text{M}}$  (nach Heidenreich & Eckstein, 1992; nach Hendry *et al.*, 1995) zu bestimmen, wurden für die beiden Ribozyme RzM1 und RzM2 konzentrationsabhängige Kinetiken durchgeführt. Das jeweilige Substrat wurde in der gleichen Konzentration eingesetzt und die Ribozymkonzentration variierte in jedem Ansatz (Kap. 2.2.26). Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde die Reaktion abgestoppt, die Produkte mittels PAGE aufgetrennt und durch Exposition auf Röntgenfilm sichtbar gemacht (Abb. 3.15, Kap. 2.2.23). Die Röntgenfilme wurden densitometrisch ausgewertet und die Werte nach den Berechnungen von Heidenreich & Eckstein (1992) bzw. nach Hendry *et al.* (1995) graphisch aufgetragen. Aus dem jeweiligen Anstieg des angenommenen linearen Bereichs zu Beginn der konzentrationsabhängigen Kinetiken wurden die Parameter  $k_{\text{cat}}/k_{\text{M}}$  berechnet (Abb. 3.16, Kap. 2.2.27).

a)

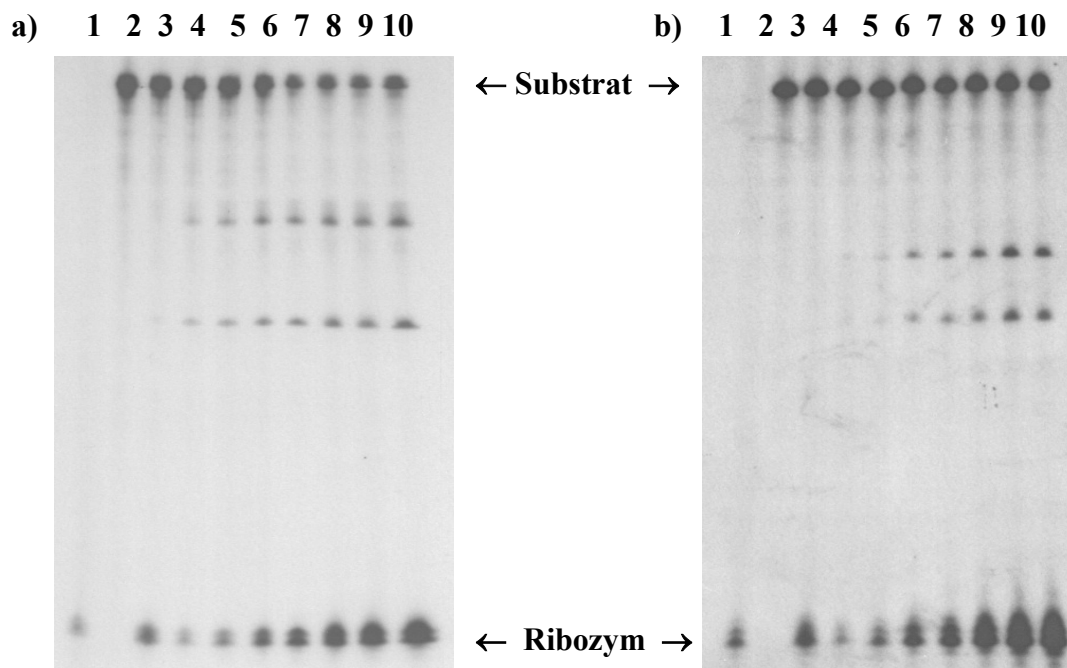


b)



**Abb. 3.14: Produkt-Zeit-Diagramm zur Bestimmung der Initialgeschwindigkeit  $v_{ini}$**

Die Autoradiographien der Zeitkinetiken (Abb. 3.13) wurden densitometrisch ausgemessen und die Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Bestimmungen mit ihren Standardabweichungen. Die verkleinerten Abbildungen stellen einen Ausschnitt aus dem Anfangsbereich der Zeitkinetik dar. Der Anstieg in diesem angenommenen linearen Bereich diente zur Berechnung von  $v_{ini}$  (Kap. 2.2.27). a) Reaktion von Ribozym RzM1 mit Substrat 2 ( $v_{ini} = 0,127 \pm 0,006$  fmol/s); b) Reaktion von Ribozym RzM2 mit Substrat 1 ( $v_{ini} = 0,086 \pm 0,005$  fmol/s).

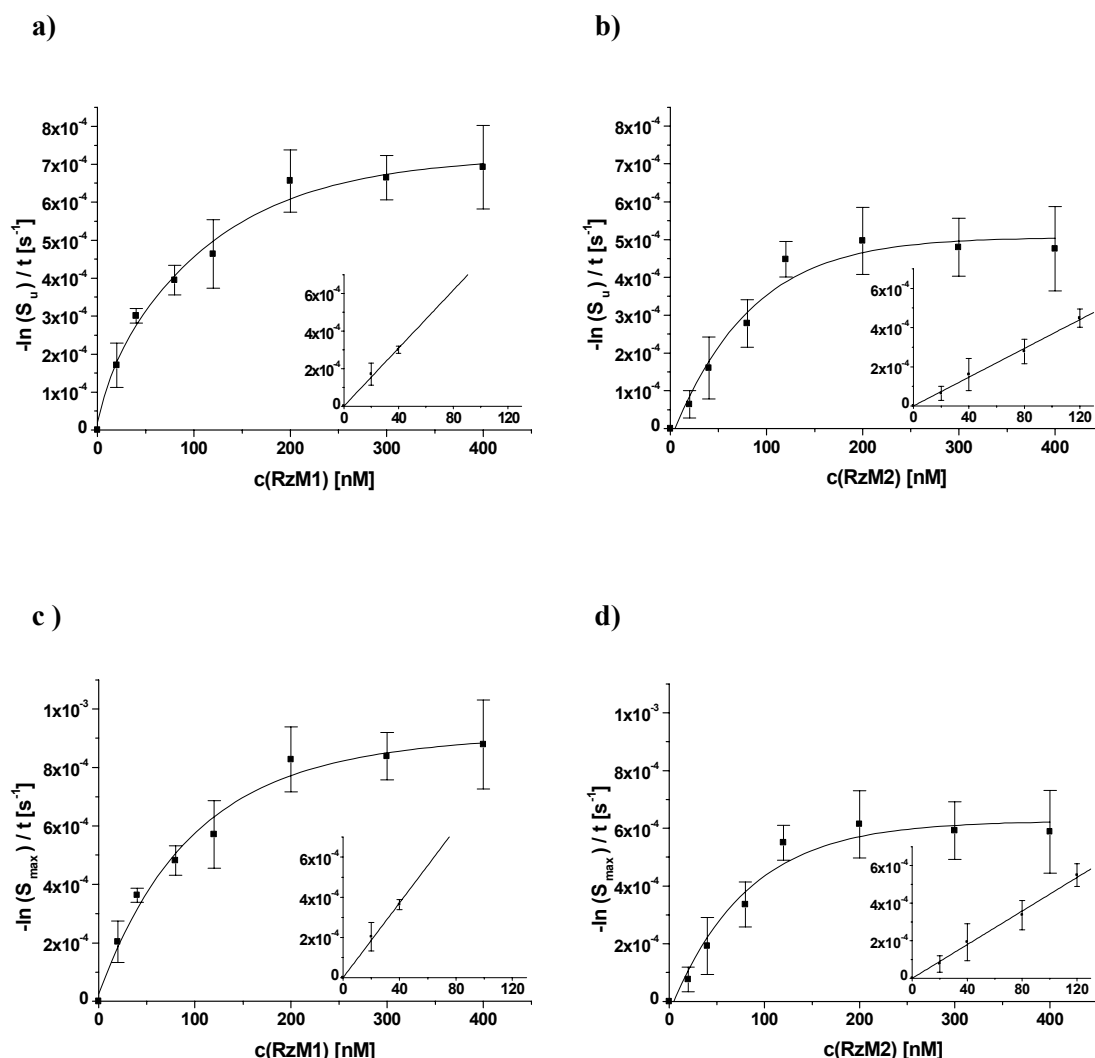


**Abb. 3.15: Abhängigkeit der Spaltung von der Konzentration der Ribozyme**

Die Substrate (40 nM) wurden mit ihren Ribozymen in verschiedenen Verhältnissen inkubiert (Kap. 2.2.26). Nach 15 min wurden die Reaktionen abgestoppt, die Produkte mittels PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Kap. 2.2.23). 1 = Ribozym; 2 = Substrat; 3 bis 10 = Ribozym + Substrat; 3 = 80 nM Ribozym, 0 min; 4 = 20 nM Ribozym; 5 = 40 nM Ribozym; 6 = 80 nM Ribozym; 7 = 120 nM Ribozym; 8 = 200 nM Ribozym; 9 = 300 nM Ribozym; 10 = 400 nM Ribozym; a) Reaktion von Ribozym RzM1 (38 nt) mit Substrat 2 (233 nt), Größe der Spaltprodukte 99 und 134 nt; b) Reaktion von Ribozym RzM2 (38 nt) mit Substrat 1 (200 nt), Größe der Spaltprodukte 110 und 90 nt.

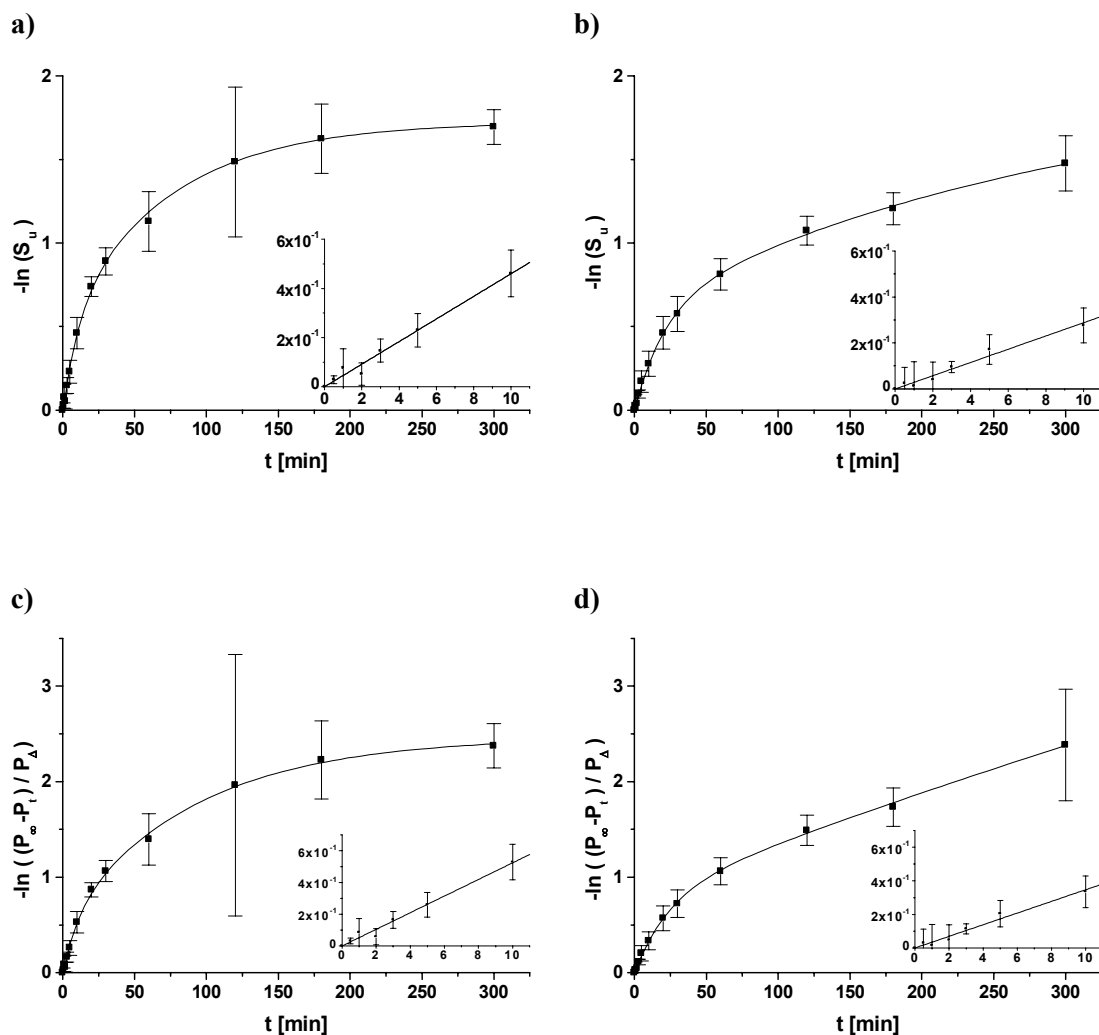
Der Unterschied zwischen den beiden Berechnungsarten besteht darin, daß Heidenreich & Eckstein (1992) das eingesetzte Substrat als Maß in die Berechnung einfließen lassen, Hendry *et al.* (1995) dagegen berücksichtigen, daß nicht das gesamte Substrat abgebaut wird. Aus diesem Grund sind die  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte nach Hendry *et al.* (1995) der Ribozyme RzM1 und RzM2 (9307 bzw. 4478  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ; Materna *et al.*, 2001) höher als die dazugehörigen  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte (7719 bzw. 3671  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ; Materna *et al.*, 2001) nach Heidenreich & Eckstein (1992). Ein höherer  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert macht deutlich, daß für den tatsächlich schneidbaren Anteil eingesetzten Substrates der katalytische Stoffumsatz  $k_{\text{cat}}$  größer und/oder die Dissoziationskonstante  $K_{\text{M}}$  kleiner als für das insgesamt eingesetzte Substrat ist. Als weiterer katalytischer Parameter wurde  $k_{\text{obs}}$  aus den zeitabhängigen Kinetiken bestimmt (Kap. 2.2.27 und Abb. 3.17), wobei ebenfalls unterschieden wurde, ob das gesamte eingesetzte Substrat als abbaubar gilt (Heidenreich *et al.*, 1994) oder nicht (Hendry *et al.*, 1995). Die  $k_{\text{obs}}$ -Werte

betragen je nach Berechnungsmethode für Ribozym RzM1  $7,66 \cdot 10^{-4}$  bzw.  $8,73 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  und für Ribozym RzM2  $4,81 \cdot 10^{-4}$  bzw.  $5,79 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Materna *et al.*, 2001).



**Abb. 3.16: Bestimmung des Parameters  $k_{\text{cat}}/k_M$**

Die Autoradiographien der konzentrationsabhängigen Kinetiken (Abb. 3.15) wurden densitometrisch ausgemessen. Entsprechend der Berechnung nach Heidenreich & Eckstein (1992) bzw. nach Hendry *et al.* (1995) wurde der negative Logarithmus des relativen Anteils des ungeschnittenen Substrats pro Zeit in Abhängigkeit von der Konzentration des Ribozyms aufgetragen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Bestimmungen mit ihren Standardabweichungen. Die verkleinerte Abbildung stellt einen Ausschnitt aus dem Anfangsbereich der konzentrationsabhängigen Kinetik dar. In diesem Bereich ist der Zusammenhang näherungsweise linear und der Anstieg diente zur Berechnung von  $k_{\text{cat}}/k_M$  (Kap. 2.2.27). a) und b) nach Heidenreich & Eckstein (1992); c) und d) nach Hendry *et al.* (1995); a) Reaktion von RzM1 mit sub2 ( $k_{\text{cat}}/k_M = 7719 \pm 284 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ); b) Reaktion von RzM2 mit sub1 ( $k_{\text{cat}}/k_M = 3671 \pm 78 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ); c) Reaktion von RzM1 mit sub2 ( $k_{\text{cat}}/k_M = 9307 \pm 312 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ); d) Reaktion von RzM2 mit sub1 ( $k_{\text{cat}}/k_M = 4478 \pm 105 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).



**Abb. 3.17: Bestimmung des Parameters  $k_{\text{obs}}$**

Die Autoradiographien der zeitabhängigen Kinetiken (Abb. 3.13) wurden densitometrisch ausgemessen. Entsprechend der Berechnung nach Heidenreich *et al.* (1994) bzw. nach Hendry *et al.* (1995) wurde der negative Logarithmus des relativen Anteils des ungeschnittenen Substrats in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Bestimmungen mit ihren Standardabweichungen. Die verkleinerte Abbildung stellt einen Ausschnitt aus dem Anfangsbereich der konzentrationsabhängigen Kinetik dar. In diesem Bereich ist der Zusammenhang näherungsweise linear und der Anstieg diente zur Berechnung von  $k_{\text{obs}}$  (Kap. 2.2.27). a) und b) nach Heidenreich *et al.* (1994); c) und d) nach Hendry *et al.* (1995); a) Reaktion von RzM1 mit sub2 ( $k_{\text{obs}} = 7,66 \cdot 10^{-4} \pm 0,29 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ); b) Reaktion von RzM2 mit sub1 ( $k_{\text{obs}} = 4,81 \cdot 10^{-4} \pm 0,23 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ); c) Reaktion von RzM1 mit sub2 ( $k_{\text{obs}} = 8,73 \cdot 10^{-4} \pm 0,33 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ); d) Reaktion von RzM2 mit sub1 ( $k_{\text{obs}} = 5,79 \cdot 10^{-4} \pm 0,27 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).

### 3.4 Inhibition von MRP2 in der Zelllinie A2780RCIS durch RzM1 und RzM2

Die Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen der *Hammerhead*-Ribozyme RzM1 und RzM2 (Kap. 3.3) haben gezeigt, daß beide Ribozyme in der Lage sind, in MRP2-Substraten im zellfreien System zu schneiden. Beide Ribozyme sind dabei ähnlich aktiv, wobei die katalytischen Parameter für RzM1 höher waren als für RzM2. Im Folgenden sollte die Wirksamkeit dieser Ribozyme in eukaryotischen Zellen getestet werden.

#### 3.4.1 Klonierung der Ribozyme und Transfektion in die Zelllinie A2780RCIS

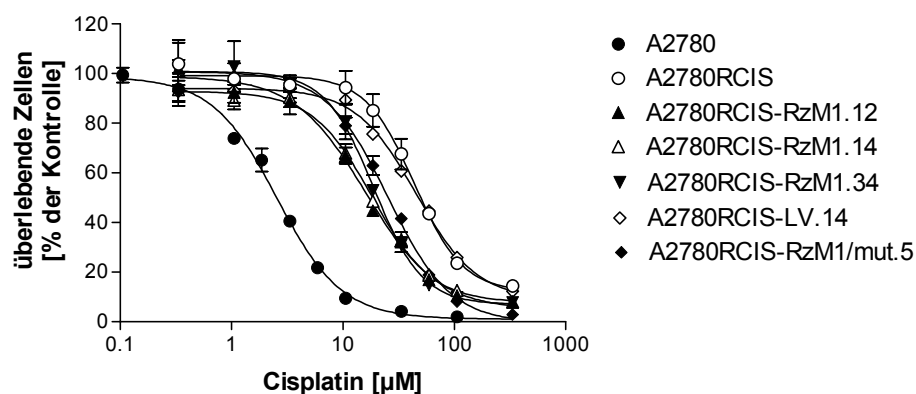
Als Modell wurde die humane Ovarialkarzinomzelllinie A2780RCIS ausgewählt, da diese bereits in den Resistenz- und Expressionsanalysen (Kap. 3.1) den größten Unterschied in bezug auf Cisplatinresistenz und MRP2-Expression im Vergleich zu ihrer parentalen Zelllinie A2780 gezeigt hatte. Die Ribozyme RzM1 und RzM2 wurden in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.0 kloniert. Zusätzlich zu den funktionell aktiven Ribozymen, wurden auch katalytisch inaktive Punktmutanten zu RzM1 und RzM2 kloniert. Das für die Funktion wichtige Adenin A<sub>14</sub> in der *Hammerhead*-Struktur des Ribozyms (Abb. 1.8) wurde durch ein Cytosin ersetzt. Die Oligonukleotide RibcMA-fw/rev (für RzM1), RibcMB-fw/rev (für RzM2), PMRibcMA-fw/rev (für RzM1/mut) und PMRibcMB-fw/rev (für RzM2/mut) wurden hybridisiert (Kap. 2.2.21) und gerichtet in den Expressionsvektor zwischen die Restriktionstellen *KpnI/XbaI* kloniert (Kap. 2.2.7. und 2.2.18). Die Plasmide wurden in *E. coli* vermehrt (Kap. 2.2.5 und 2.2.6) und zur Kontrolle der korrekten Sequenz und Orientierung sequenziert (Kap. 2.2.19). Die Zelllinie A2780RCIS wurde mit RzM1, RzM2, RzM1/mut, RzM2/mut im Expressionsvektor oder dem unveränderten Expressionsvektor pcDNA3.0 transfiziert (Kap. 2.2.3). Nach der Selektion mit G418 wurden für RzM1 und RzM2 je 36 Klone, für RzM1/mut, RzM2/mut je 12 und den Leervektor (LV) 18 Klone vereinzelt und propagiert.

#### 3.4.2 Resistenzverhalten in den A2780RCIS-Ribozym-Transfektanten

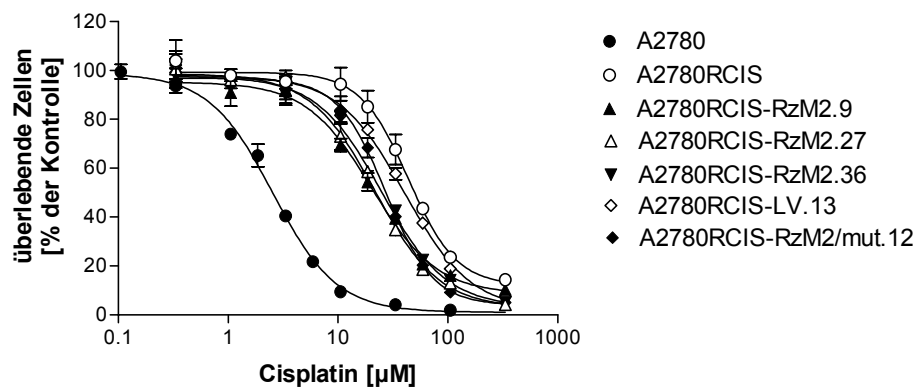
Die durch Transfektion erhaltenen Klone (Kap. 3.4.1) wurden im Proliferationsassay gegenüber Cisplatin getestet (Kap. 2.2.33). Für Ribozym RzM1 wurden 5 Klone und für Ribozym RzM2 6 Klone mit verändertem IC<sub>50</sub>-Wert gegenüber Cisplatin gefunden (Beispiele

in Abb. 3.18). Diese Klone waren im Vergleich zur Ausgangslinie A2780RCIS sensibler und zeigten eine Verringerung der  $IC_{50}$  um 43 bis 63 Prozent gegenüber Cisplatin. Keiner der Leervektortransfektanten zeigte eine Veränderung gegenüber Cisplatin in diesem Assay. Bei den Klonen mit den katalytisch inaktiven Ribozymen zeigten einzelne Klone ebenfalls eine Sensibilisierung. Daher wurde je ein Effekt-Klon von RzM1/mut und RzM2/mut in den folgenden Untersuchungen mitgeführt.

a)



b)



**Abb. 3.18: Sensitivität der A2780RCIS-RzM-Klone gegenüber Cisplatin**

Alle Zellen wurden kontinuierlich 5 Tage in cisplatinhaltigen Medien unterschiedlicher Konzentration kultiviert. Die am Ende der Inkubationszeit vorhandene Zellmenge wurde durch Färbung der membranständigen Proteine mittels SRB photometrisch bestimmt (Kap. 2.2.33). Die Menge der cisplatinfrei inkubierten Zellen wurde 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichungen einer repräsentativen Dreifachbestimmung. A2780 ist die untransfizierte sensible Ausgangslinie und A2780RCIS die untransfizierte cisplatinresistente Variante zur parentalen Line A2780. Die anderen untersuchten Zelllinien sind Transfektanten der Zelllinie A2780RCIS: mit Anti-MRP2-Ribozym (a) RzM1 oder (b) RzM2, mit Leervektor (LV) oder mit mutiertem Ribozym (RzM1/mut oder RzM2/mut).



**Tab. 3.6: IC<sub>50</sub>-Werte für Cisplatin, Carboplatin, Daunorubicin, Vincristin und Etoposid der A2780RCIS-RzM-Klone.**

Zelllinie	IC <sub>50</sub> – (Rf)				
	Cisplatin	Carboplatin	Daunorubici	Etoposid	Vincristin
	[μM]	[μM]	n [nM]	[nM]	[pM]
A2780	2,6 (1,0) ***	10,8 (1,0) ***	5,0 (1,0) ***	28,5 (1,0) ***	832 (1,0) n.s.
A2780RCIS	43,7 (16,8) n.s.	233,0 (21,6) n.s.	19,1 (3,8) n.s.	493,5 (17,3) n.s.	724 (0,9) n.s.
A2780RCIS-RzM1, Klon 12	16,1(6,2) ***	203,5 (18,8) n.s.	14,9 (3,0) n.s.	210,7 (7,4) *	737 (0,9) n.s.
A2780RCIS-RzM1, Klon 13	32,1 (12,3) *	139,2 (12,9) **	14,6 (2,9) n.s.	189,2 (6,6) **	841 (1,0) n.s.
A2780RCIS-RzM1, Klon 14	18,3 (7,0) ***	181,7 (16,8) n.s.	13,2 (2,6) *	328,3 (11,5) n.s.	837 (1,0) n.s.
A2780RCIS-RzM1, Klon 22	24,1 (9,2) **	90,4 (8,4) ***	14,8 (3,0) n.s.	134,7 (4,7) **	902 (1,1) n.s.
A2780RCIS-RzM1, Klon 34	19,0 (7,3) ***	155,3 (14,4) n.s.	12,9 (2,6) n.s.	86,7 (3,0) **	493 (0,6) **
A2780RCIS-RzM2, Klon 9	20,3 (7,8) ***	126,2 (11,7) **	9,7 (1,9) **	145,5 (5,1) **	871 (1,0) n.s.
A2780RCIS-RzM2, Klon 12	23,2 (8,9) **	190,1 (17,6) n.s.	16,6 (3,3) n.s.	391,9 (13,7) n.s.	340 (0,4) ***
A2780RCIS-RzM2, Klon 27	21,7 (8,3) ***	136,3 (12,6) **	12,6 (2,5) *	222,5 (7,8) *	423 (0,5) ***
A2780RCIS-RzM2, Klon 29	24,5 (9,4) ***	98,5 (9,1) **	13,7 (2,7) n.s.	139,6 (4,9) **	294 (0,4) ***
A2780RCIS-RzM2, Klon 35	17,9 (6,2) ***	174,5 (16,2) n.s.	11,1 (2,2) **	109,3 (3,8) **	300 (0,4) ***
A2780RCIS-RzM2, Klon 36	24,9 (9,6) **	242,3 (22,4) n.s.	12,4 (2,5) *	238,9 (8,4) *	445 (0,5) ***
A2780RCIS-RzM1/mut, Klon 5	25,4 (9,8) ***	141,2 (13,1) **	10,3 (2,1) **	251,7 (8,8) *	998 (1,2) **
A2780RCIS-RzM2/mut, Klon 12	27,1 (10,4) **	72,5 (6,7) ***	17,7 (3,5) n.s.	220,7 (7,7) *	399 (0,5) ***
A2780RCIS-LV, Klon 7	36,7 (14,1) n.s.	205,9 (19,1) n.s.	18,2 (3,6) #	548,7 (19,3) #	666 (0,8) *
A2780RCIS-LV, Klon 13	40,4 (15,4) #	207,7 (19,2) #	n. a.	n. a.	778 (0,9) #
A2780RCIS-LV, Klon 14	45,6 (17,5) n.s.	267,9 (24,8) n.s.	n. a.	n. a.	643 (0,8) **

n. a. = nicht analysiert. Die angegebenen IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch nichtlineare Regression mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf unter Nutzung des Programms GraphPad PRISM ermittelt. In Klammern ist der Resistenzfaktor Rf relativ zur Zelllinie A2780 angegeben. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem *Student's T-Test*, 2-seitig, überprüft (n.s. = nicht signifikant; \* = P<0,05; \*\* = P<0,01; \*\*\* = P<0,001) und bezieht sich auf eine mit # gekennzeichnete Leervektortransfektante.

Die ausgewählten Klone wurden auf ihr Kreuzresistenzmuster gegenüber den Zytostatika Carboplatin, Etoposid, Daunorubicin und Vincristin im Proliferationsassay mittels SRB getestet. Die Transfektanten für die Ribozyme RzM1 und RzM2 zeigten ebenfalls eine

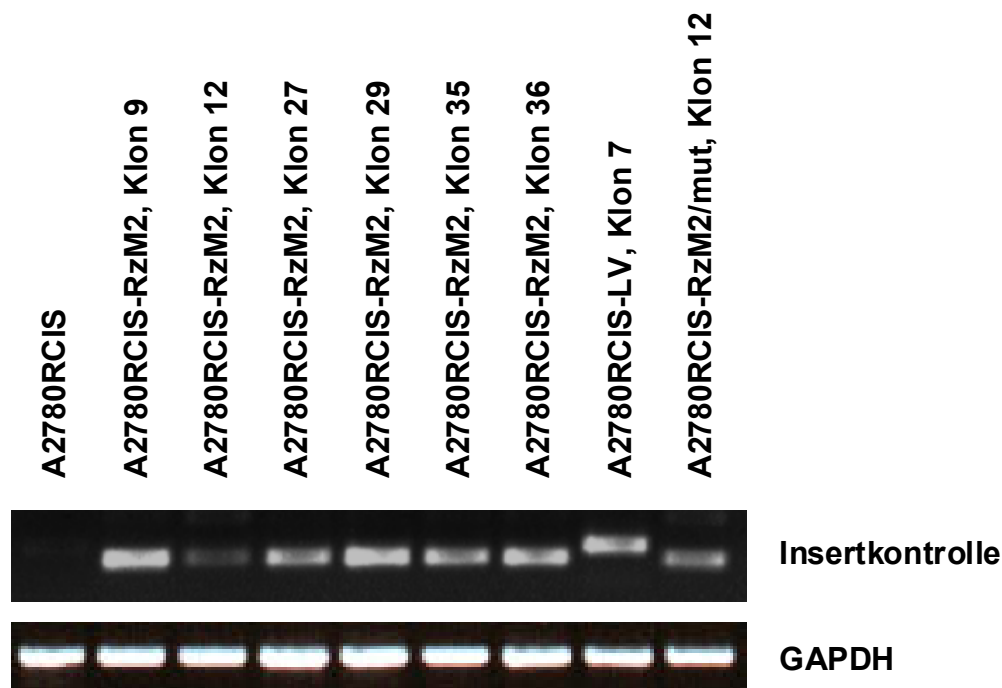
Resensitivierung gegenüber Carboplatin (Ausnahme: A2780RCIS-RzM2, Klon 36). Die  $IC_{50}$  verringerte sich hierbei um 13 bis 61 Prozent. Die Klone waren ebenfalls sensibler gegenüber Daunorubicin und Etoposid. Die  $IC_{50}$ -Werte verringerten sich hier um 13 bis 50 bzw. 21 bis 83 Prozent. Die Verringerungen der  $IC_{50}$  gegenüber Carboplatin, Daunorubicin und Etoposid waren jedoch nicht in allen Fällen statistisch signifikant (Tab. 3.6).

Bei Behandlung mit Vincristin zeigte die Hälfte der Transfektanten ein sensitiveres Verhalten mit einer Halbierung der  $IC_{50}$ . Diesen Unterschied gibt es aber nicht bei Vergleich der parental sensiblen Zelllinie A2780 und ihrer cisplatinresistenten Variante A2780RCIS. Deswegen ist davon auszugehen, daß dieser Effekt nicht von der Expressionshöhe von MRP2 abhängt.

Die Leervektortransfektanten zeigten in Resistenzbestimmungen gegenüber Carboplatin, Daunorubicin, Vincristin und Etoposid keine Veränderungen im Vergleich zur untransfizierten Ausgangslinie A2780RCIS. Die Klone, die mit einem katalytisch inaktivem Ribozym transfiziert wurden, zeigten ähnliche Effekte wie die Transfektanten mit den Ribozymen RzM1 und RzM2. Die Ergebnisse dieser Kreuzresistenzuntersuchungen sind in der Tabelle 3.6 zusammengefaßt.

### 3.4.3 MRP2-Expression in den A2780RCIS-Ribozym-Transfektanten

Es wurde zunächst überprüft, ob die Transfektanten wirklich den Expressionsvektor enthalten und das Ribozym exprimieren. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus den Klonen isoliert (Kap. 2.2.8), cDNA synthetisiert (Kap. 2.2.10 und 2.2.14) und RT-PCR mit den Primern vector-fw/rev durchgeführt, welche im Expressionsvektor binden (Kap. 2.2.15). Das PCR-Produkt enthielt somit Teile des Vektors und die Ribozym-Sequenz. Da das Ribozym gerichtet zwischen die Restriktionsschnittstellen für *KpnI* und *XbaI* kloniert wurde, und der dafür entfernte Vektorbereich länger war als die inserierte Ribozym-Sequenz, ist das PCR-Produkt aus den Leervektortransfektanten größer als aus den Ribozym-Transfektanten. Alle untersuchten Klone enthielten den Expressionsvektor. Das Ergebnis für die Transfektanten von RzM2 in A2780RCIS ist in der Abbildung 3.19 dargestellt.

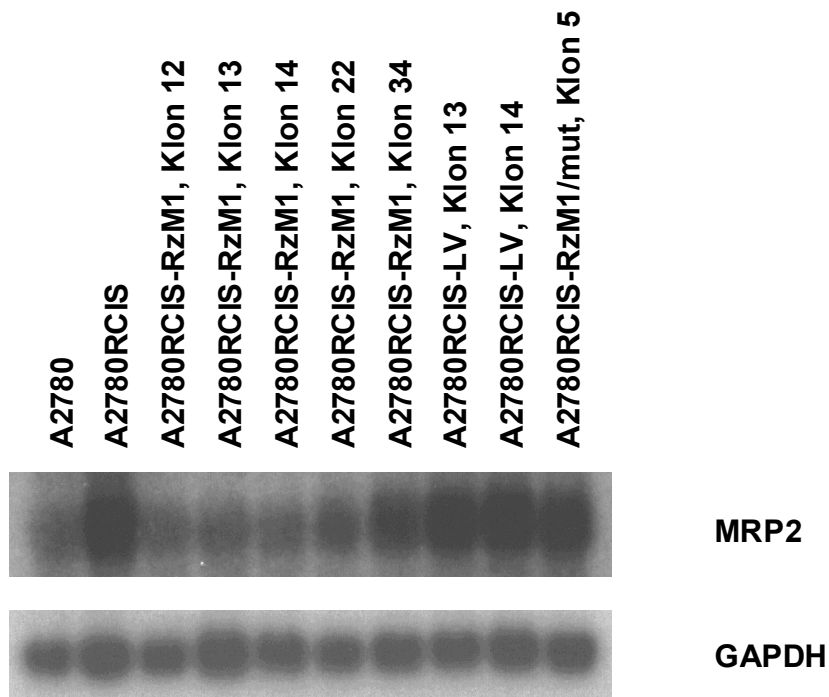


**Abb. 3.19: Insertkontrolle mittels RT-PCR der Transfektanten A2780RCIS-RzM2**

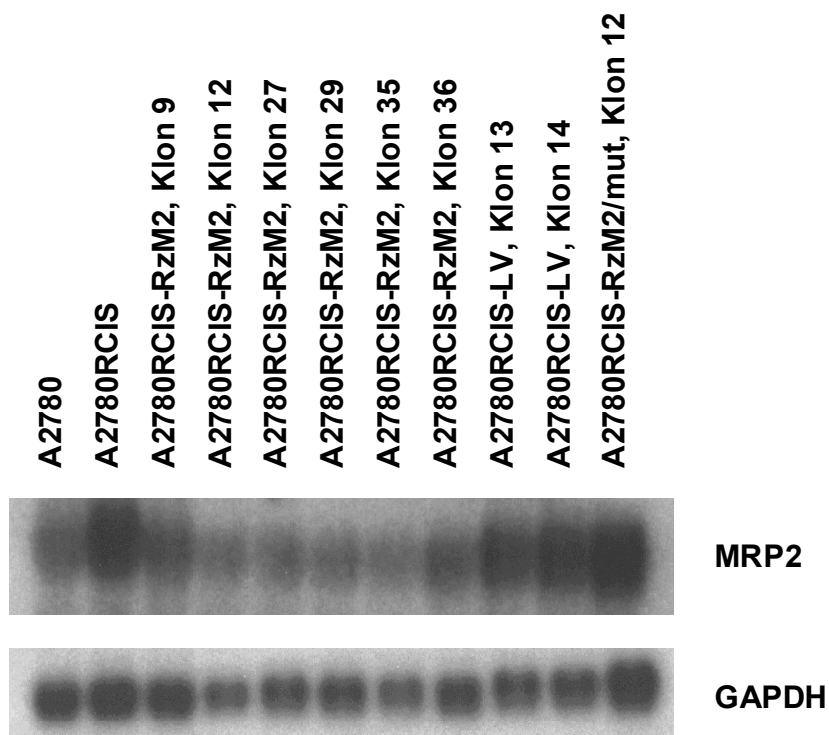
Die Expression des Ribozyms RzM2 wurde nach Transfektion in A2780RCIS mittels RT-PCR überprüft (Kap. 2.2.15). Die Amplifikation erfolgte mit den Primern vector-fw/rev, welche im Vektor pcDNA3.0 binden. Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde eine RT-PCR für GAPDH durchgeführt. Zu den unterschiedlichen PCR-Produktlängen siehe Text.

Mittels Northern-Blot sollte untersucht werden, ob sich die Expression der MRP2-mRNA in den Transfektanten für die Anti-MRP2-Ribozyme RzM1 und RzM2 verändert d. h. vermindert hat (Kap. 2.2.8 bis 2.2.13). Es zeigte sich, daß die Expression der MRP2-mRNA in allen Klonen mit funktionsfähigem Ribozym im Vergleich zu der untransfizierten cisplatinresistenten Zelllinie A2780RCIS und den Leervektortransfektanten geringer war. Die meisten dieser Ribozym-Transfektanten wiesen eine MRP2-mRNA-Expression auf, die mit der in der cisplatin sensitiven parentalen Zelllinie A2780 vergleichbar war (Abb. 3.20). Die Klone, die mit katalytisch inaktivem Ribozym transfiziert wurden, zeigten eine ähnliche Expression von MRP2-mRNA wie die Zelllinie A2780RCIS und die Leervektortransfektanten.

a)



b)



**Abb. 3.20: Expression der MRP2-mRNA in den A2780RCIS-RzM-Klonen**

Die aus den Zelllinien isolierte Gesamt-mRNA wurde in einem formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonmembran übertragen. Eine durch RT-PCR generierte MRP2-Sonde (453 bp) wurde radioaktiv markiert und mit der membrangebundenen MRP2-mRNA hybridisiert. Das Ausmaß der Expression wurde durch Exposition mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Zur Kontrolle der Beladung wurde mit einer GAPDH-Sonde hybridisiert (Kap. 2.2.8 bis 2.2.13).

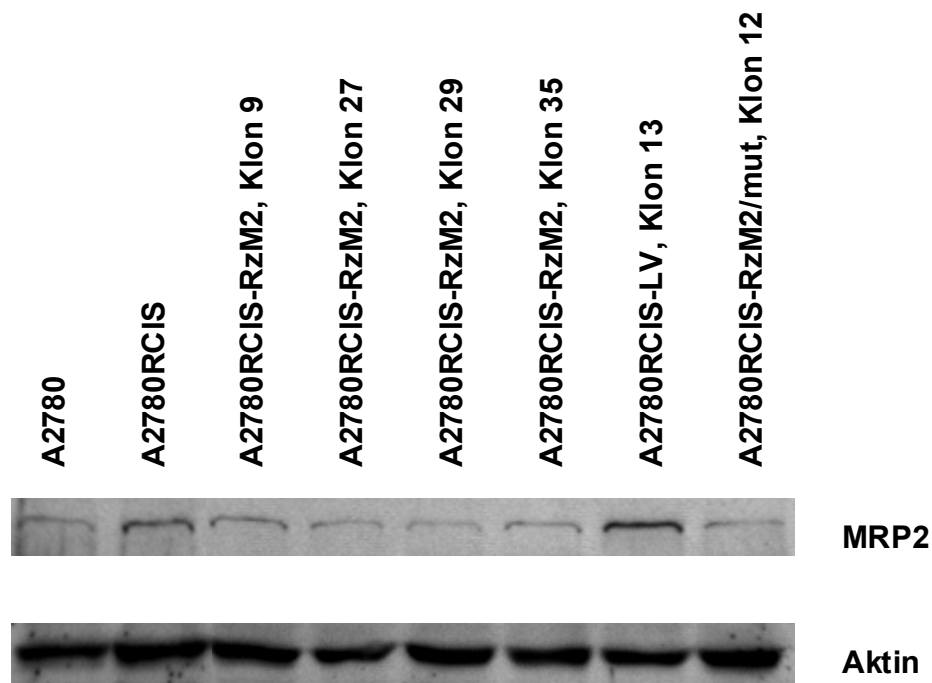
Um die Expression von MRP2 zu quantifizieren, wurde für die Transfektanten *real-time*-RT-PCR durchgeführt (Kap. 2.2.15). Die cDNAs wurden hinsichtlich ihrer Molekülzahlen für MRP2 und GAPDH analysiert und die Expression von MRP2 auf GAPDH normalisiert. Auch diese Bestimmungen zeigten, daß die MRP2-mRNA-Menge in den Transfektanten für die Ribozyme RzM1 und RzM2 geringer war als in der Ausgangszelllinie A2780RCIS und den Leervektortransfektanten. Wie auch schon in der Northern-Blot-Analyse festgestellt werden konnte, wurde in einigen Klonen die MRP2-mRNA auf das Level der sensiblen parentalen Zelllinie A2780 gesenkt (Tab. 3.7). Im Gegensatz zum Northern-Blot wurde hier allerdings deutlich, daß auch das Level der MRP2-mRNA in den Transfektanten mit katalytisch

**Tab. 3.7: *Real-time*-RT-PCR zur Quantifizierung der MRP2-Expression in den A2780RCIS-RzM-Klonen.**

<b>Zelllinie</b>	<b>MRP2-mRNA-Expression (normalisiert auf GAPDH)<sup>a</sup></b>	<b>Faktor der Über- expression (x-fach)<sup>b</sup></b>
A2780	0,0028	1,0
A2780RCIS	0,0556	19,9
A2780RCIS-RzM1, Klon 12	0,0062	2,2
A2780RCIS-RzM1, Klon 13	0,0022	0,8
A2780RCIS-RzM1, Klon 14	0,0038	1,4
A2780RCIS-RzM1, Klon 22	0,0202	7,2
A2780RCIS-RzM1, Klon 34	0,0433	15,5
A2780RCIS-RzM2, Klon 9	0,0077	2,8
A2780RCIS-RzM2, Klon 12	0,0002	0,1
A2780RCIS-RzM2, Klon 27	0,0097	3,5
A2780RCIS-RzM2, Klon 29	0,0028	1,0
A2780RCIS-RzM2, Klon 35	0,0027	1,0
A2780RCIS-RzM2, Klon 36	0,0145	5,2
A2780RCIS-RzM1/mut, Klon 5	0,0273	9,8
A2780RCIS-RzM2/mut, Klon 12	0,0290	10,4
A2780RCIS-LV, Klon 13	0,0609	21,8
A2780RCIS-LV, Klon 14	0,0565	20,2

<sup>a</sup>Die Expression für GAPDH und MRP2 wurde in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt. Der Mittelwert wurde gebildet und die MRP2-Expression im Verhältnis zur GAPDH-Expression ausgedrückt. <sup>b</sup>Der Faktor der Überexpression bezieht sich auf die parentale Zelllinie A2780.

inaktivem Ribozym gesenkt war, wenn auch nicht so stark wie in den meisten Klonen mit katalytisch aktivem Ribozym. Um zu überprüfen, ob die beiden Anti-MRP2-Ribozyme RzM1 und RzM2 in der Lage sind das Expressionslevel von MRP2 auch auf Proteinebene zu senken, wurde aus den Transfektanten-Zelllinien Membranproteine isoliert und diese im Western-Blot mit einem MRP2-Antikörper analysiert (Kap. 2.2.28 bis 2.2.32). Es konnten die Senkung der MRP2-Expression in den RzM1- und RzM2-Transfektanten bestätigt werden (RzM2-Transfektanten als Beispiel in Abb. 3.21). Die Proteinexpression von MRP2 wurde in den Transfektanten mit katalytisch inaktivem Ribozym ebenfalls deutlich gesenkt.

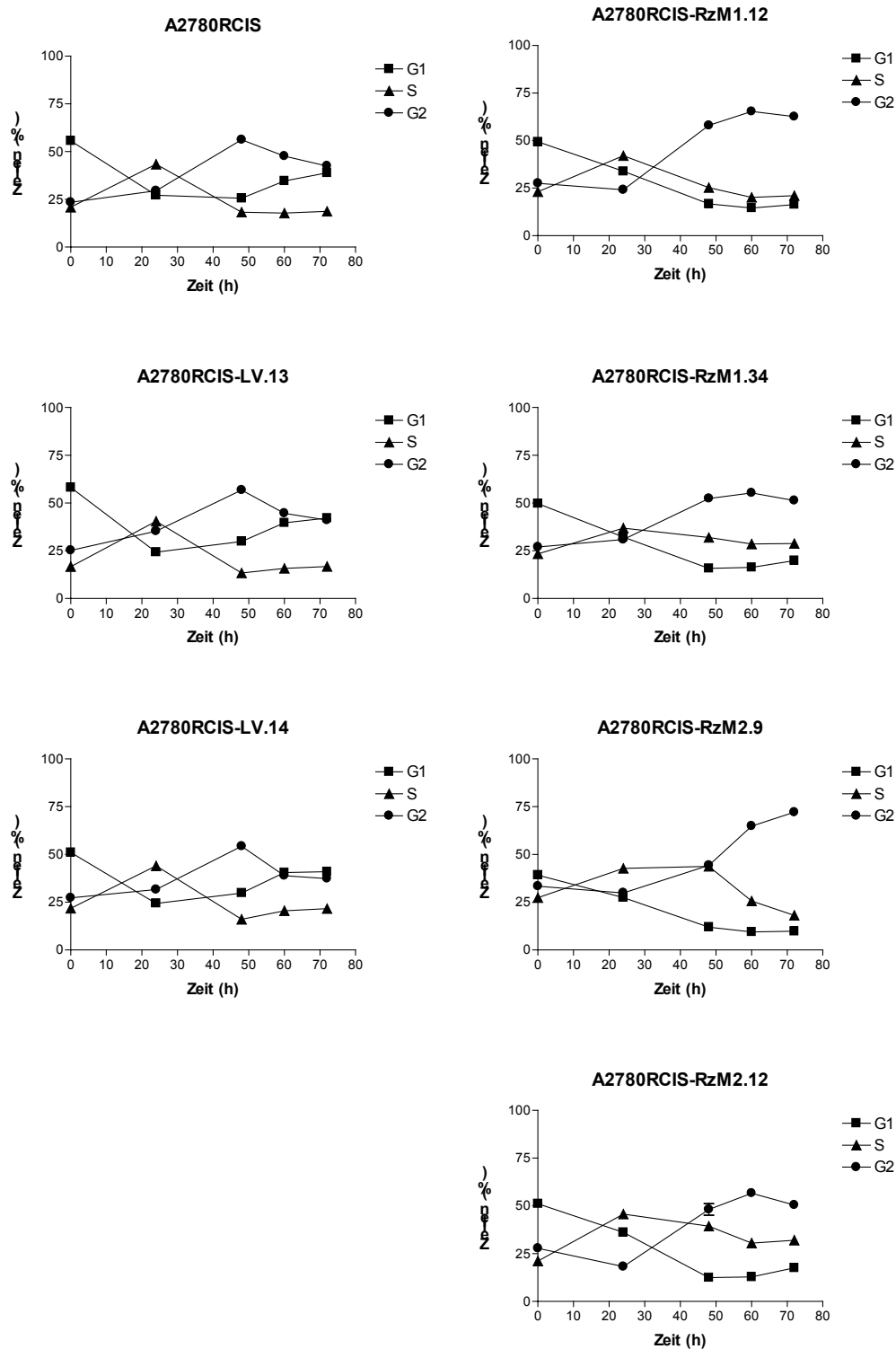


**Abb. 3.21: Expression von MRP2 in den A2780RCIS-RzM2-Klonen**

Die aus den Zelllinien isolierten Membranproteine wurden in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Nach dem Blocken wurde die Membran gleichzeitig mit Anti-MRP2-Antikörper und Anti-Aktin-Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem Chemolumineszenz-System (Kap. 2.2.28 bis 2.2.32).

### 3.4.4 Zellzyklus und Apoptose in den A2780RCIS-Ribozym-Transfektanten

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob und wie sich die A2780RCIS-Ribozym-Transfektanten hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Cisplatin von der untransfizierten resistenten Ausgangszelllinie A2780RCIS unterscheiden. Die Zellen wurden mit 100  $\mu$ M Cisplatin kontinuierlich über mehrere Tage behandelt und die adhärennten Zellen nach



**Abb. 3.22: Zellzyklusanalysen in den A2780RCIS-RzM-Klonen**

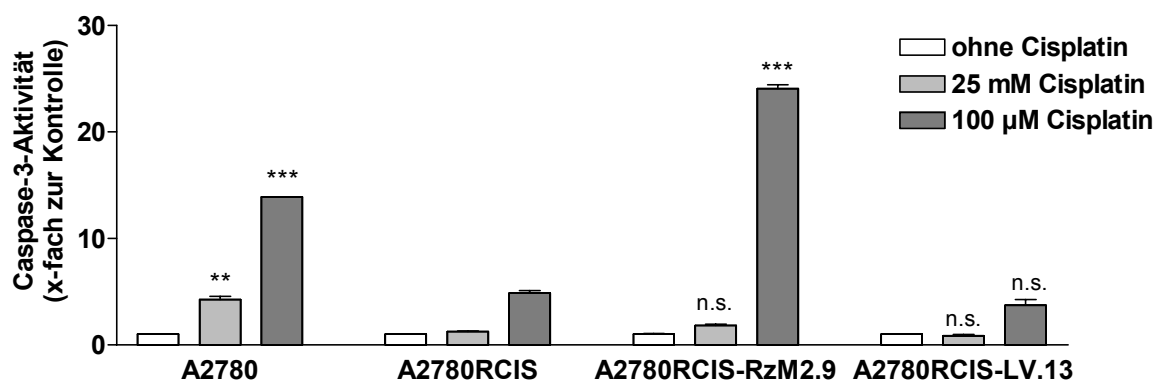
Es ist der prozentuale Anteil der Zellen an den Zellzyklusphasen G1, S und G2 nach kontinuierlicher Behandlung mit 100  $\mu$ M Cisplatin dargestellt (Kap. 2.2.36). Gezeigt ist die zeitliche Veränderung für die untrans-fizierte Zelllinie A2780RCIS, die Leervektortransfektanten A2780RCIS-LV Klon 13 und 14 sowie für die RzM1-Transfektanten Klon 12 und 34 und für die RzM2-Transfektanten Klon 9 und 12.

verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Es wurden eine Propidiumiodidfärbung durchgeführt und im Durchflußzytometer der DNA-Gehalt in den Zellen bestimmt (Kap. 2.2.36). Der prozentuale Anteil der Zellen in bestimmten Zellzyklusphasen wurde bestimmt und die transfizierten Zellen mit der untransfizierten Zelllinie A2780RCIS und den Kontrolltransfektanten verglichen (Abb. 3.22). In den unbehandelten Zellpopulationen befanden sich die meisten Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Die cisplatinresistente Ausgangszelllinie A2780RCIS reagierte nach 24-stündiger Cisplatinbehandlung mit einem Anstieg der Zellen in der S-Phase und einem sinkenden Anteil der Zellen in der G1-Phase. Nach 48 Stunden befanden sich die meisten Zellen in der G2-Phase. In den kommenden Stunden konnte sich ein Fraktion der Zellen teilen (Übergang in die G1-Phase), die anderen arretierten in der G2-Phase. Die Zellpopulationen der Leervektortransfektanten (Klone 13 und 14) verhielten sich wie die Zelllinie A2780RCIS. Vergleicht man diese Profile mit jenen der Transfektanten für die Ribozyme RzM1 und RzM2, stellt man fest, daß die ribozymtransfizierten Zellen hauptsächlich in der G2-Phase arretieren und sich im zeitlichen Verlauf von 3 Tagen nur wenige Zellen teilen können. Außerdem wurden im Zellkulturüberstand mehr tote Zellen beobachtet als vergleichsweise in der A2780RCIS und den Leervektortransfektanten.

Es sollte untersucht werden, ob sich die Ribozym-Transfektanten in bezug auf Apoptose-Induktion von der Ausgangslinie A2780RCIS unterscheiden. Die Zelllinien A2780 und A2780RCIS, sowie die Ribozym-Transfektante A2780RCIS-RzM2 Klon 9 und die Leervektortransfektante A2780RCIS-LV Klon 13 wurden ausgewählt und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cisplatin für 24 h behandelt. Es wurden Zellysate hergestellt und auf ihre Caspase-3-Aktivität untersucht (Kap. 2.2.35). Die gefundenen Aktivitäten wurde auf die Grundaktivität der Zelllinie A2780 (ohne Cisplatin-Behandlung) normalisiert und miteinander verglichen (Abb. 3.23). Mit steigender Konzentration von Cisplatin stieg die Caspase-3-Aktivität in allen Zelllinien an, was auf ein vermehrtes Auslösen von Apoptose schließen läßt. Die Ribozymtransfektante RzM2 Klon 9 zeigte eine höhere Induktion im Vergleich zur Ausgangszelllinie A2780RCIS und der Leervektortransfektante (A2780RCIS-LV Klon 13). Bei einer Konzentration von 100 µM Cisplatin war die Induktion sogar größer als in der sensiblen parentalen Zelllinie A2780.



Die Proliferationsuntersuchungen der Ribozymtransfektanten (Kap. 3.4.2) hatten gezeigt, daß sich die Zellen gegenüber verschiedener Zytostatika sensibler verhalten, jedoch konnte durch diese Tests nicht entschieden werden, ob die Zellen unter der Behandlung absterben oder nur im Wachstum gehemmt werden. Durch die Zellzyklusbetrachtungen und die Apoptose-Induktion über Caspase-3-Aktivierung konnte gezeigt werden, daß beide Vorgänge nebeneinander ablaufen und es wurde bestätigt, daß die Ribozymtransfektanten sensibler auf das Zytostatikum Cisplatin reagieren als die resistente untransfizierte Zelllinie A2780RCIS. Beim Einsatz in der Zellkultur lassen sich insgesamt keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen den beiden getesteten Anti-MRP2-Ribozymen RzM1 und RzM2 feststellen.



**Abb. 3.23: Caspase-3-Aktivität nach Cisplatinbehandlung in den Anti-MRP2-Ribozym-Klonen**

Die Zellen wurden 24 h mit Cisplatin behandelt. In den Zellysaten wurde die Caspase-3-Aktivität bestimmt (Kap. 2.2.35). Die Aktivitäten wurden auf die unbehandelte parentale Zelllinie A2780 normalisiert. Bei A2780RCIS-RzM2.9 handelt es sich um eine Anti-MRP2-Ribozym-Transfektante mit ihrer Klon-Nummer und bei A2780RCIS-LV.13 handelt es sich um eine Leervektor-Transfektante. A2780 ist die untransfizierte sensible Ausgangslinie und A2780RCIS die untransfizierte cisplatinresistente Variante zur parentalen Linie A2780. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem *Student's T-Test*, 2-seitig, überprüft (n.s. = nicht signifikant; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ ) und bezieht sich auf die Zelllinie A2780RCIS.

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Resistenzuntersuchungen an humanen Tumorzelllinien

Das Ausmaß der Cisplatinresistenz und das Kreuzresistenzmuster der Zelllinien A2780 vs. A2780RCIS, D43/86 vs. D43/86RCIS und Mewo vs. MewoRCIS wurde unter Nutzung eines Proliferationsassays bestimmt. Als Grundlage für die Ermittlung von Resistenzfaktoren wurde der IC<sub>50</sub>-Wert herangezogen, ein Verfahren, das allgemein anerkannt ist und häufig genutzt wird, Sensitivitäten von Zelllinien gegenüber Zytostatika zu beurteilen (Perez *et al.*, 1993; Kellner *et al.*, 1997; Bergman *et al.*, 2000). In die Kreuzresistenzbetrachtungen wurden die Zytostatika Carboplatin, Daunorubicin, Etoposid und Vincristin einbezogen. Der Vergleich der Sensitivitäten gegenüber Cisplatin zeigte, daß die Zelllinie A2780RCIS die höchste Resistenz aufwies. Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine Kreuzresistenz gegenüber dem strukturell verwandten Carboplatin, was darauf hindeutet, daß bei diesem Zytostatikum ein ähnlicher Resistenzmechanismus vorliegt. Kreuzresistenzen gegenüber Daunorubicin und Etoposid traten nur in zwei der drei untersuchten Zelllinienmodelle auf. Dies läßt darauf schließen, daß sich die untersuchten Zelllinien hinsichtlich der Faktoren unterscheiden, die diese Resistenzen bewirken und/oder unterstützen. Eine Resistenz gegenüber Vincristin wurde in keiner der Zelllinien festgestellt. Für die Zelllinie MewoRCIS war aus anderen Untersuchungen bekannt, daß diese auch gegenüber Fotemustin, nicht aber gegenüber Doxorubicin, Vindesin und Mitomycin C kreuzresistent sind (Kern *et al.*, 1997).

### 4.2 Expression von chemoresistenzassoziierten Genen

Die humanen Tumorzelllinien A2780, A2780RCIS, D43/86, D43/86RCIS, Mewo und MewoRCIS wurden mittels RT-PCR hinsichtlich der Expression verschiedener Gene untersucht, die aufgrund der Assoziation mit Chemoresistenz bekannt waren (Kool *et al.*, 1997; Doyle *et al.*, 1998; Lage *et al.*, 1999). Für die vergleichenden Expressionsanalysen wurden die ABC-Transporter MDR1, MRP1, MRP2 und BCRP, die zum MMR-System gehörenden Faktoren hMLH1, hMSH2 und hPMS2, sowie das Strukturprotein LRP ausgewählt.

Die Genexpression des ABC-Transporters MDR1, welcher für die klassische Multidrug-Resistenz verantwortlich ist, zeigte in diesen Expressionsvergleichen kein einheitliches Bild. Die Zelllinien A2780RCIS, D43/86, D43/86RCIS und Mewo wiesen in den RT-PCR-Analysen eine deutliche Expression von MDR1 auf. In den Zelllinien A2780 und MewoRCIS war die MDR1-Expression nur schwach nachzuweisen. Obwohl aus anderen Untersuchungen bekannt ist, daß P-Glykoprotein nicht im Zusammenhang mit Cisplatinresistenz steht (Lincke *et al.*, 1990; Minemura *et al.*, 1999), hilft dieser Expressionvergleich bei der Bewertung der gefunden Kreuzresistenzen in den Zelllinien. So kann die Kreuzresistenz gegenüber Daunorubicin und Etoposid in der Zelllinie A2780RCIS zumindest anteilig auf P-Glykoprotein zurückgeführt werden. Die Sensitivität gegenüber Vincristin, welches von P-Glykoprotein ebenfalls transportiert werden kann, wurde trotz der differentiellen Expression von MDR1 in den Zelllinien nicht beeinflusst.

Die cisplatinresistente Zelllinie A2780RCIS zeigte eine verminderte Expression von hMLH1. Eine verringerte Expression von Genen des MMR-Systems für chemoresistente Varianten der Zelllinie A2780 wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. So zeigten doxorubicin- und cisplatinresistente Varianten dieser Zelllinie einen Verlust der Expression von hMLH1 und hPMS2, aber keine veränderte Expression von hMSH2 (Drummond *et al.*, 1996). Für eine chlorambucilresistente Variante der Zelllinie A2780 konnte keine Expressionsveränderung für hMLH1 nachgewiesen werden (Roy *et al.*, 2000). Für die Zelllinie MewoRCIS konnte unter Nutzung von Northern- und Western-Blot gezeigt werden, daß eine um 35 % für hMLH1 und um 70 % für hMSH2 verminderte Expression vorliegt (Lage *et al.*, 1999; Helmbach *et al.*, 2002). Durch die in dieser Arbeit verwendete RT-PCR, ohne Optimierung für die exponentielle Phase der PCR, war jedoch dieser Unterschied für die Zelllinie MewoRCIS nicht detektierbar. Diese Untersuchungen lassen vermuten, daß die verminderte Expression der MMR-Gene in den Zelllinien A2780RCIS und MewoRCIS anteilig an der Cisplatinresistenz beteiligt sind. Für LRP, hMSH2 und hPMS2 wurden mit der angewandten RT-PCR-Methode in den sechs Tumorzelllinien keine Expressionsunterschiede gefunden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß bei einer genauen Quantifizierung mittels *real-time* RT-PCR Unterschiede nachgewiesen werden könnten.

Die chemosensitive Ovarialkarzinomzelllinie A2780 zeigte in den RT-PCR-Analysen eine deutliche Expression von BCRP-mRNA, wohingegen sie in der cisplatinresistenten Variante

A2780RCIS kaum nachzuweisen war (Abb. 3.6). Aus anderen Untersuchungen in unserem Labor ist bekannt, daß sich die Zelllinie A2780RCIS sehr sensitiv gegenüber dem Zytostatikum Mitoxantron verhält und bei Konzentrationen abstirbt, bei denen die parentale Zelllinie noch wachsen kann (persönliche Kommunikation, Helga Kemmer). Dies ist möglicherweise auf die höhere Expression von BCRP zurückzuführen (Ross *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 1999), das neben der Resistenzentwicklung gegenüber Mitoxantron auch mit der Resistenz gegenüber Anthrazyklinen und Topotecan in Zusammenhang gebracht wird (Doyle *et al.*, 1998; Rocchi *et al.*, 2000). Der Grund für die verminderte Expression von BCRP in der Zelllinie A2780RCIS unter Selektionsdruck von Cisplatin ist nicht bekannt. In den anderen beiden Zelllinienpaaren – D43/86 *vs.* D43/86RCIS sowie Mewo *vs.* MewoRCIS – wurde eine solche Veränderung nicht beobachtet. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß die auftretende Cisplatinresistenz in der Zelllinie A2780RCIS auf die verminderte BCRP-Expression zurückzuführen ist. Die durch den Einsatz eines Anti-BCRP-Ribozyms erreichte Verringerung der BCRP-Expression verursachte keine Sensitivitätsveränderung gegenüber Cisplatin (Kowalski *et al.*, 2002).

Der ABC-Transporter MRP1 ist durch die Vermittlung der Resistenz gegenüber Doxorubicin, Vincristin und Etoposid bekannt geworden (Grant *et al.*, 1994). In Lungenkrebspatienten konnte eine Erhöhung der MRP1-Expression nach platinbasierter Chemotherapie festgestellt werden (Oguri *et al.*, 1998). Durch Transfektionsexperimente wurde aber ein funktioneller Zusammenhang von MRP1 mit der Cisplatinresistenz weitgehend ausgeschlossen (Cole *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1998). In den RT-PCR-Analysen der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls keine Assoziation von erhöhter MRP1-Expression und der Resistenz gegenüber Cisplatin.

In den cisplatinresistenten Zelllinien A2780RCIS, D43/86RCIS und MewoRCIS zeigte sich eine erhöhte MRP2-Expression im Vergleich zu ihrer jeweiligen parentalen Zelllinie, wobei die Expression in der Zelllinie A2780RCIS am höchsten war. Die zunächst mittels RT-PCR gefundenen Expressionsunterschiede konnten durch Northern-Blot- und Western-Blot-Analyse bestätigt und mittels *real-time*-RT-PCR quantifiziert werden. Die erhöhte Expression von MRP2 wurde auch in weiteren cisplatinresistenten Zelllinien beschrieben (Kool *et al.*, 1997; Narasaki *et al.*, 1997). Das deutet darauf hin, daß es sich hierbei um einen generellen Resistenzmechanismus handelt. Aufgrund des größten Expressionsunterschieds für MRP2

und der höchsten Resistenz gegenüber Cisplatin wurden die Zelllinien A2780 und A2780RCIS für die funktionellen Analysen der MRP2-vermittelten Cisplatinresistenz ausgewählt.

#### 4.3 Charakterisierung von Anti-MRP2-Hammerhead-Ribozymen *in vitro*

Es wurden zwei *Hammerhead*-Ribozyme, RzM1 und RzM2, konstruiert, um die mit Cisplatinresistenz assoziierte MRP2-mRNA zu spalten. Die Effizienz der ribozymvermittelten Spaltung wurde im zellfreien System untersucht. *Hammerhead*-Ribozyme wurden bisher erfolgreich benutzt um u. a. die chemoresistenz-vermittelnden Faktoren P-Glykoprotein (Kobayashi *et al.*, 1994; Holm *et al.*, 1995), BCRP (Kowalski *et al.*, 2001 und 2002), LRP (Kitazono *et al.*, 1999) und  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (Iida *et al.*, 2001) zu modulieren. Die in dieser Arbeit beschriebenen *Hammerhead*-Ribozyme RzM1 und RzM2 sind die ersten Ribozyme, die die mRNA des ABC-Transporters MRP2 spalten können.

Nicht alle durch computergestützte Methoden ausgewählten Schnittstellen für ein *Hammerhead*-Ribozym erweisen sich auch als geeignet für den katalytischen Angriff (Wichert *et al.*, 1999; Kowalski *et al.*, 2001). Der Grund für diese Diskrepanz besteht in der lediglichen Annäherung des Computermodells an die tatsächlich vorhandene mRNA-Sekundärstruktur. Selbst Ribozyme, die sich *in vitro* als wirksam erweisen, können sich danach in der Zelle als unwirksam herausstellen, da die tatsächlichen Bedingungen in der Zelle, wie lokale Ionenkonzentrationen, pH-Wert und Temperatur, nicht genau bekannt sind. Außerdem können z. B. RNA-bindende Proteine Einfluß auf die Faltung der mRNA und die Zugänglichkeit der Bindungsstelle für das Ribozym haben (Lee *et al.*, 1997). Für die *in vitro*-Schnittversuche wurden die Reaktionsbedingungen so gewählt, daß sie sich den physiologischen Bedingungen weitestgehend annähern (10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7,5 und 37 °C), obwohl aus kinetischen Versuchen bekannt ist, daß sich die Spaltaktivität mit steigender  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration erhöht, bei 37 °C und 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  ein pH-Optimum bei ca. 9,5 besteht und Ribozyme bei 42 °C höhere kinetische Parameter aufweisen (Hendry *et al.*, 1995; Holm *et al.*, 1995). Durch diese Maßnahme wurde die Vorhersagefähigkeit der *in vitro*-Schnittversuche für die Anwendung in der Zellkultur erhöht. Die Anti-MRP2-Ribozyme RzM1 und RzM2 wurden mittels computergestützter RNA-Sekundärstruktur-Analyse ausgewählt. Die wesentlichen Kriterien dabei waren die Nutzung von 5'-GUC-3'-Tripletts als nutzbare Spaltstellen und die Lage dieser Tripletts in vermutlich einzelsträngigen Bereichen

der RNA-Sekundärstruktur. Es konnte gezeigt werden, daß man durch diesen Ansatz katalytisch aktive *Hammerhead*-Ribozyme generieren kann.

Ein weiteres Problem bei der Ribozym-Konstruktion stellt die Beobachtung dar, daß häufig Ribozyme kurze RNA-Substrate sehr gut spalten können, jedoch bei längeren Substraten eine geringere katalytische Aktivität zeigen (Heidenreich und Eckstein, 1992; Bertrand *et al.*, 1994). Große RNA-Moleküle können komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen bilden, die die Zugänglichkeit der Spaltstelle für das Ribozym beeinträchtigen können. Die Assoziation des Ribozyms an seine Zielsequenz stellt sehr wahrscheinlich den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Spaltprozeß dar. Außerdem können durch tertiäre Interaktionen die Dissoziation des Ribozyms von seinen gespaltenen Produkten behindert werden, so daß das Ribozym nicht für weitere Spaltreaktionen zur Verfügung steht (Hendry und McCall, 1995). Spaltversuchen mit längeren Substraten eignen sich daher besser, um die Spalteffizienz eines Ribozyms zu beurteilen. Um diesen Problemen Rechnung zu tragen, wurden für die *in vitro*-Charakterisierung der Ribozyme in dieser Arbeit längere Substrate von 200 und 233 nt verwendet.

Die Initialgeschwindigkeit  $v_{ini}$  sowie die Reaktionsparameter  $k_{cat}/k_M$  und  $k_{obs}$  der Anti-MRP2-*Hammerhead*-Ribozyme, RzM1 und RzM2, zeigen vergleichbare Werte zu denen anderer Ribozyme (Tab. 4.1). Die katalytischen Parameter zeigen große Ähnlichkeiten zu denen des Anti-GPC3-*Hammerhead*-Ribozyms (Wichert *et al.*, 1999). Die nach den beiden Berechnungsmethoden ermittelten  $k_{cat}/k_M$ -Werte (Heidenreich und Eckstein, 1992; Hendry *et al.*, 1995) der Ribozyme RzM1 und RzM2 unterscheiden sich jedoch weniger voneinander. Das deutet darauf hin, daß bei den Anti-MRP2-Ribozymen insgesamt mehr von dem angebotenen Substrat umgesetzt werden konnte als bei dem Anti-GPC3-Ribozym (80 %, Abb.3.14 vs. 40 %, Wichert *et al.*, 1999). Bisher ist nicht geklärt, weshalb Ribozyme bei diesen *in vitro*-Schnittversuchen nicht das gesamte angebotene Substrat umsetzen können. Die vergleichbaren katalytischen Parameter zu anderen Ribozymen lassen darauf schließen, daß sich die ausgewählten Schnittstellen in der MRP2-mRNA für die Spaltung durch die konstruierten Ribozyme eignen und beide Ribozyme eine hohe katalytische Aktivität aufzeigen. Bei Vergleich der katalytischen Parameter der beiden Anti-MRP2-Ribozyme scheint RzM1 der bessere Kandidat für einen Einsatz in der Zelle zu sein.

**Tab. 4.1:** Katalytische Parameter verschiedener *Hammerhead*-Ribozyme.

Zielsequenz	Zitat	Substratlänge [nt]	$v_{ini}$ [fmol·s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/k_M$ [M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$k_{obs}$ [s <sup>-1</sup> ]
MRP2 (RzM1)	Materna <i>et al.</i> , 2001	233	0,127	7719 <sup>a</sup> ; 9307 <sup>b</sup>	7,66*10 <sup>-4</sup> <sup>c</sup> ; 8,73*10 <sup>-4</sup> <sup>b</sup>
MRP2 (RzM2)	Materna <i>et al.</i> , 2001	200	0,086	3671 <sup>a</sup> ; 4478 <sup>b</sup>	4,81*10 <sup>-4</sup> <sup>c</sup> ; 5,79*10 <sup>-4</sup> <sup>b</sup>
GPC3	Wichert <i>et al.</i> , 1999	234	0,155	4700 <sup>a</sup> ; 10600 <sup>b</sup>	n. a.
BCRP	Kowalski <i>et al.</i> , 2001	343	2,21	24180 <sup>a</sup> ; 55000 <sup>b</sup>	1,17*10 <sup>-2</sup> <sup>c</sup> ; 2,68*10 <sup>-2</sup> <sup>b</sup>
HIV-1 LTR	Heidenreich und Eckstein, 1992	985	n. a.	22-500 <sup>a</sup>	n. a.
Pit-950	Bertrand <i>et al.</i> , 1994	950	n. a.	500 <sup>a</sup>	n. a.
<i>Krüppel</i>	Hendry und McCall, 1995	13	n. a.	166667 <sup>b</sup>	1,48*10 <sup>-1</sup> <sup>b</sup>
TAT	Hendry und McCall, 1995	13	n. a.	5333 <sup>b</sup>	4,0*10 <sup>-3</sup> <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Berechnung nach Heidenreich und Eckstein, 1992; <sup>b</sup> Berechnung nach Hendry *et al.*, 1995; <sup>c</sup> Berechnung nach Heidenreich *et al.*, 1994.

#### 4.4 Rolle von MRP2/cMOAT/ABCC2 bei der Cisplatinresistenz

Die vollständige Sequenz des humanen MRP2 wurde durch Sequenzierung überlappender cDNA-Klone ermittelt (Taniguchi *et al.*, 1996). Nachfolgend wurden chemoresistente Tumorzelllinien auf MRP2-Expression untersucht, jedoch beschrieb man lange Zeit nur Assoziationen der Expression und dem Auftreten von Resistenz (Kool *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Narasaki *et al.*, 1999). Zu Beginn dieser Arbeit war der funktionelle Zusammenhang von MRP2-Expression und Chemoresistenz noch nicht nachgewiesen worden. Nachdem die vollständige MRP2-cDNA-Sequenz kloniert war, wurden erste Transfektionsexperimente mit dem humanen MRP2 durchgeführt (Kawabe *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Übersicht in König *et al.*, 1999), wobei eine Resistenzerhöhung

gegenüber Cisplatin, Doxorubicin, Epirubicin, Vincristin, Vinblastin und gelegentlich Etoposid, sowie Methotrexat (Hooijberg *et al.*, 1999) erreicht wurde.

Die Zelllinien A2780 und A2780RCIS besitzen mutiertes MRP2, wobei diese Mutation in keinem konservierten Bereich liegt. In den ebenfalls untersuchten Zelllinien D43/86, D43/86RCIS, Mewo und MewoRCIS war MRP2 im untersuchten Sequenzabschnitt nicht mutiert. Da sich die Zelllinien A2780 und A2780RCIS hinsichtlich ihrer Expression dieses mutierten MRP2 und ihrer Sensitivität gegenüber Cisplatin unterschieden, wurde davon ausgegangen, daß sich diese Mutation nicht nachteilig auf den Transport auswirkt. Der offene Leserahmen des mutierten MRP2 wurde für die Transfektion in die Zelllinie A2780 benutzt, um den Mutationsstatus von MRP2 in diesem Zellsystem nicht zu verändern. Es konnte eine geringe Überexpression von MRP2 in der Zelllinie A2780 erreicht werden, wobei die MRP2-mRNA-Expression in den Transfektanten nicht an die Expressionshöhe in der Zelllinie A2780RCIS heranreichte.

Entsprechend der geringen Überexpression in den MRP2-transfizierten A2780-Zellen wurde in den Transfektanten nur eine leichte Resistenzhöhung gegenüber Cisplatin und Carboplatin erreicht, wobei der Unterschied zur untransfizierten Ausgangszelllinie A2780 dennoch statistisch signifikant war ( $P < 0,05$ ). Die MRP2-Transfektanten zeigten keine Kreuzresistenz gegenüber Daunorubicin, gegenüber Etoposid und Vincristin war das Verhalten uneinheitlich. Es konnte somit der Zusammenhang von MRP2-Expression und Resistenz gegenüber Cisplatin und Carboplatin funktionell bestätigt werden.

Die *in vitro* charakterisierten Anti-MRP2- *Hammerhead* Ribozyme RzM1 und RzM2 wurden in die cisplatinresistenten Zelllinie A2780RCIS transfiziert und so auf ihre Wirksamkeit im Zelllinienmodell getestet. Die untersuchten Ribozym-Transfektanten beider Ribozyme zeigten eine Reduktion von MRP2 auf mRNA- und Proteinebene, in einigen Klonen bis auf das MRP2-Expressionsniveau der chemosensitiven A2780. Obwohl das Ribozym RzM1 bei den vorangegangenen *in vitro*-Test die höheren kinetischen Werte aufwies, ließ sich bei dem Einsatz in der Zellkultur kein Unterschied in der Wirksamkeit der Ribozyme RzM1 und RzM2 feststellen. Beide Ribozyme waren in der Lage, die MRP2-Expression in den Tumorzellen zu verringern. Die Transfektanten mit katalytisch inaktiven Ribozymen, RzM1/mut und RzM2/mut zeigten ebenfalls eine Reduktion der MRP2-Expression und eine



verminderte Resistenz gegenüber Cisplatin und Carboplatin. Antisense-Effekte der 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen der katalytisch inaktiven Ribozyme könnten dieses Verhalten erklären. Ebenfalls mitgeführte Leervektortransfektanten stellten sicher, daß es sich bei den gefundenen Effekten nicht um Transfektionsartefakte handelt. Durch Applikation der Anti-MRP2-Ribozyme, RzM1 und RzM2, konnte eine Sensitivierung gegenüber Cisplatin bis zu 63 % erreicht werden. Es konnte somit ebenfalls der Zusammenhang von MRP2-Expression und der Sensitivität gegenüber Cisplatin und Carboplatin durch die Anwendung von Anti-MRP2-Ribozymen demonstriert werden. Die veränderte Sensitivität gegenüber Daunorubicin und Etoposid darauf hin, daß MRP2 an weiteren Resistenzen beteiligt sein kann. Da diese Kreuzresistenzen jedoch nicht in der Zelllinie D43/86RCIS und den A2780-MRP2-Transfektanten auftraten, kann man darauf schließen, daß bei der durch MRP2-vermittelten Resistenz gegenüber Daunorubicin und Etoposid weitere Faktoren beteiligt sind. Gegenüber Vincristin ergab sich kein einheitliches Resistenzverhalten; die Hälfte der Klone zeigte eine Sensitivierung, die andere Hälfte nicht. Da sich die Zelllinien A2780 und A2780RCIS nicht in ihrer Sensitivität gegenüber Vincristin unterscheiden, wohl aber deutlich in der MRP2-Expression, ist davon auszugehen, daß diese klonal auftretenden Sensitivitätsunterschiede nicht (bzw. nicht allein) auf MRP2 zurückzuführen sind. In anderen MRP2-Transfektionsexperimenten konnte eine Kreuzresistenz gegenüber Vincristin festgestellt werden (Keppler *et al.*, 1999; Kawabe *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999; Cui *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang wäre denkbar, daß MRP2 einen weiteren Faktor für die Ausschleusung von Vincristin benötigt, der in den Zelllinien A2780 und A2780RCIS heterogen exprimiert wird.

Obwohl in einigen Anti-MRP2-Ribozym-Transfektanten die MRP2-Expression auf mRNA und Proteinebene auf das Level der sensiblen Ausgangszelllinie A2780 vermindert wurde, konnte die Sensitivität gegenüber Cisplatin nicht vollständig wiederhergestellt werden. Das deutet daraufhin, daß in der Zelllinie A2780RCIS mehrere Mechanismen bei der Cisplatinresistenz zusammenwirken. Der Mutationsstatus von *p53* wurde in den sechs Tumorzelllinien bestimmt. Nur in der Ovarialkarzinomzelllinie A2780 lag Wildtyp-*p53* vor. In den Zelllinien A2780RCIS, D43/86, D43/86RCIS, Mewo und MewoRCIS war *p53* mutiert, wobei die Mutationen in der für die Funktion wichtigen DNA-Bindungs- oder Oligomerisierungsdomäne lagen. Das mutierte *p53*-Gen, sowie die festgestellte Reduktion der hMLH1-Expression könnten somit in der Zelllinie A2780RCIS bei der Cisplatinresistenz eine

Rolle spielen. Beide Faktoren wurden auch von anderen Arbeitsgruppen im Zusammenhang mit Cisplatinresistenz beschrieben (Aebi *et al.*, 1996; Drummond *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997; Siddik *et al.*, 1998; Fink *et al.*, 1998; Giaccone, 2000). Es wurde ebenfalls gezeigt, daß Selektion mit Cisplatin zu Mutationen in *p53* und Reduktion der cisplatin-induzierten Apoptose führt (Perego *et al.*, 1996). Darüberhinaus gibt es weitere Faktoren, die die Resistenz gegenüber Cisplatin vermitteln können. So wurde durch den Einsatz von Ribozymen gegen *c-fos* (Funato *et al.*, 1997), *K-ras* (Funato *et al.*, 2000) und  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (Nagata *et al.*, 2001; Iida *et al.*, 2001) eine Sensitivierung gegenüber Cisplatin erreicht.

MRP2 ist ein ABC-Transporter, der Konjugate mit Glutathion und Glukuronsäure oder als Sulfate transportieren kann (Kawabe *et al.*, 1999). Aus Untersuchungen war bekannt, daß MRP2 Cisplatin gemeinsam mit Glutathion in einem Verhältnis von 1:2 transportieren kann (Ishikawa und Ali-Osman, 1993) und cisplatinresistente Zelllinien häufig erhöhte Mengen an Glutathion besitzen (Parekh *et al.*, 1996; Kool *et al.*, 1997). Außerdem konnten resistente Tumorzellen durch Senkung des Glutathiongehalts oder durch Beeinflussung des Glutathionstoffwechsels resensitiviert werden (Chen *et al.*, 1998; Ban *et al.*, 1996). Um die Cisplatinresistenz durch den Transport über MRP2 näher zu untersuchen, wurden die Glutathiongehalte der Zelllinien A2780, A2780RCIS, D43/86, D43/86RCIS, Mewo und MewoRCIS bestimmt und miteinander verglichen. Die Zelllinie A2780RCIS wies dabei den höchsten Gehalt an reduziertem Glutathion auf, welches für die Konjugation von Cisplatin die entscheidende Fraktion ist. Welche Stoffwechselveränderungen zu diesem erhöhten Glutathiongehalt in der Zelllinie A2780RCIS führen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, wobei eine veränderte Expression und/oder Aktivität von Glutathion-S-Transferasen und der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ( $\gamma$ -GCS) denkbar sind. Für eine andere cisplatinresistente Variante der Zelllinie A2780 wurde die Überexpression einer Untereinheit der  $\gamma$ -GCS beschrieben (Yao *et al.*, 1995). Es wurde auch gezeigt, daß eine erhöhte  $\gamma$ -GCS-Expression zu einem erhöhten Transport von Glutathionkonjugaten und Resistenz gegenüber Cisplatin führt (Kurokawa *et al.*, 1995). Die Zelllinie D43/86RCIS enthielt ebenfalls mehr Glutathion, jedoch waren die Unterschiede nicht so groß wie für die Zelllinie A2780RCIS. Die Zelllinie MewoRCIS zeigte keinen veränderten Glutathiongehalt. Durch den erhöhten Gehalt an reduziertem Glutathion im Zusammenhang mit der erhöhten Expression von MRP2 ist die

Zelllinie A2780RCIS in der Lage, an Glutathion konjugiertes Cisplatin aus der Zelle hinaus zu transportieren.

ABC-Transporter, die Glutathionkonjugate transportieren können, wurden häufig im Zusammenhang mit der Entgiftung von Schwermetallen beschrieben (Ishikawa *et al.*, 1997). MRP2-homologe Proteine wurden in vielen Organismen gefunden, so z. B. in *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* und *Rattus norvegicus*. Diese MRP2-verwandten Proteine zeigen häufig Assoziationen und funktionelle Zusammenhänge mit der Resistenz gegenüber Metallen, z. B. Arsen, Cadmium, Quecksilber und Kupfer (Dijkstra *et al.*, 1996; Broeks *et al.*, 1996; Sugawara *et al.*, 1997 und 1998; Bauer *et al.*, 1999; Kala *et al.*, 2000; Theodoulou, 2000; Liu *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde MRP2 in seiner Bedeutung für die Cisplatin- und Carboplatinresistenz beschrieben. Man kann MRP2 deshalb auch als Metalltransporter bezeichnen.

#### **4.5 Veränderungen in Zellzyklus und Apoptose nach MRP2-Modulation**

Cisplatin schädigt die Zellen hauptsächlich durch Cisplatin-DNA-Addukte, was zu verstärkter Reparatur und einer Arretierung des Zellzykluses in der G2-Phase führt. Sind die auftretenden DNA-Schäden zu umfangreich gehen die Zellen in die Apoptose (Jordan und Carmo-Fonseca, 2000). Die beschrittenen Wege sind je nach zellulärem Hintergrund und Abhängigkeit vom Zytostatikum verschieden (Jones *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien A2780 und A2780RCIS, sowie die A2780-MRP2-Transfektanten und die A2780RCIS-Anti-MRP2-Ribozymtransfektanten unter Cisplatinbehandlung auf die Veränderungen der Apoptoseinduktion und ihres Zellzykluses untersucht.

In Tumorzellen kommt es nach der Behandlung mit Zytostatika häufig zum programmierten Zelltod (Debatin, 2000), wobei man die beschrittenen Signalwege im Wesentlichen der rezeptor- und der mitochondrienvermittelten Apoptose zuordnen kann (Kaufmann und Earnshaw, 2000). Beide Wege münden in der Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, wobei vor allem die Aktivierung von Caspase-3 als Maß für das Auslösen von Apoptose herangezogen werden kann (Lage *et al.*, 2001b, Helmbach *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte mittels Caspase-3-Aktivitätsbestimmung gezeigt werden, daß MRP2-Transfektion in

die Zelllinie A2780 zu einer geringeren Apoptose-Induktion unter Cisplatinbehandlung im Vergleich zur untransfizierten Ausgangszelllinie führt. Die Transfektion von Anti-MRP2-Ribozymen in die cisplatinresistente, MRP2-überexprimierende Zelllinie A2780RCIS führte zu einer höheren Induktion von Apoptose im Vergleich zu untransfizierten Zelllinie. In den Zellzyklus-Untersuchungen zeigten die A2780-MRP2-Transfektanten unter Cisplatinbehandlung eine geringere Schädigung im Vergleich zur untransfizierten, cisplatin sensiblen Ausgangszelllinie A2780. Die A2780RCIS-Ribozym-Transfektanten zeigten dagegen eine höhere Schädigung im Vergleich zur untransfizierten cisplatinresistenten Zelllinie A2780RCIS. Unterstützend zu diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die A2780-MRP2-Transfektanten nach Cisplatinbehandlung weniger Cisplatin-DNA-Addukte in ihrem Genom anhäufen als die parentale Zelllinie A2780. Ebenso wurde für die A2780RCIS-Anti-MRP2-Ribozym-Transfektanten gezeigt, daß diese mehr Cisplatin-DNA-Addukte aufweisen als die untransfizierte Ausgangszelllinie A2780RCIS (persönliche Kommunikation, Bernd Liedert, Universitätsklinikum Essen). Der Zusammenhang zwischen MRP2-Expression und Sensitivität gegenüber Cisplatin konnte somit durch Caspase-3-Aktivitätsbestimmung, Zellzyklusanalysen und Nachweis von Cisplatin-DNA-Addukten funktionell bestätigt werden.

#### 4.6 Praxisrelevanz und Ausblick

Für die Untersuchung des Zusammenhangs von Cisplatinresistenz und MRP2-Expression wurde in dieser Arbeit die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 als Modell ausgewählt. Da in der Therapie des Ovarialkarzinoms häufig Cisplatin verwendet wird, besitzen die Ergebnisse aus den Zelllinien A2780 und A2780RCIS auch Bedeutung für diese Tumorerkrankung. Das Ovarialkarzinom ist die Haupttodesursache bei den gynäkologischen Tumoren in der westlichen Welt (Parker *et al.*, 1997). Platinverbindungen zeigen bei der Behandlung dieser Karzinome die beste Wirksamkeit (Ozols und Young, 1991), wobei der *p53*-Mutationsstatus eine entscheidende Rolle für den Therapieerfolg spielt (Righetti *et al.*, 1996). Überexpression von *p53* ist meist mit dem Vorhandensein von Mutationen in *p53* assoziiert. 30 bis 60 % aller Ovarialkarzinome sind in der Immunhistochemie positiv für TP53 (Levesque *et al.*, 1995; van der Zee *et al.*, 1995). Die Therapie des Ovarialkarzinoms stellt nach wie vor ein Problem dar. Die meist auftretenden Rezidive werden u. a. mit Taxol, Topotecan und Etoposid behandelt, zeigen aber nur ein Ansprechen von ca. 20 % (Dunton, 1997).

Untersuchungen zur Expression von Reparaturgenen, Glutathion-S-Transferase- $\pi$  und Topoisomerasen in Ovarialkarzinompatientinnen erbrachten keine Korrelationen von Expression und Ansprechen auf eine platinbasierende Chemotherapie (Codegoni *et al.*, 1997). Aus immunhistochemischen Untersuchungen an mehr als 100 Ovarialkrebspatientinnen für P-Glykoprotein, MRP1, MRP2 und LRP ließen sich keine Vorhersagen für den Therapieerfolg ableiten (Arts *et al.*, 1999), wobei hier nur der Zustand vor der Therapie betrachtet wurde. Expressionsveränderungen während der Therapie, die das Überleben der Patientinnen beeinflussen könnten, wurden nicht untersucht. Für das Ovarialkarzinom konnte außerdem gezeigt werden, daß Patienten mit einer hohen Glutathion-S-Transferase- $\pi$ -Expression und hohem Glutathionlevel, der u. a. den Transport von Cisplatin begünstigt, schlechter auf eine Therapie mit Cisplatin und Etoposid ansprechen im Vergleich zu jenen mit niedrigen Werten für die beiden genannten Faktoren (Kigawa *et al.*, 1998). Da die Bedeutung von MRP2 für die Cisplatinresistenz in Patienten noch nicht ausreichend geklärt ist, sind weitere Untersuchungen an Patientenkollektiven nötig.

Eine Reihe von Tumoren zeigen eine Überexpression für mehrere Transporter, die Zytostatika aus der Zelle hinaus transportieren können (Soini *et al.*, 2001). Somit gestaltet sich die Auswahl für die Therapie geeigneter Zytostatika als schwierig. MRP2 wird nur in wenigen gesunden Geweben exprimiert (Kool *et al.*, 1997). Zudem bleiben Dubin-Johnson-Syndrom-Patienten, bei denen MRP2 defekt ist, durch das Fehlen von Beeinträchtigungen häufig unerkannt (Zimniak, 1993). Bei einer Gentherapie mittels *Hammerhead*-Ribozymen gegen MRP2-mRNA wären daher nur wenige Nebenwirkungen zu erwarten. Da außerdem die häufig exprimierten ABC-Transporter MDR1 und MRP1 nicht für die Cisplatinresistenz verantwortlich sind (Lincke *et al.*, 1990; Cole *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1998; Minemura *et al.*, 1999), könnte die Unterdrückung der MRP2-Expression in Kombination mit einer Cisplatin/Carboplatin-Behandlung so zu einer verbesserten Therapie maligner Tumoren führen.

---

**Literaturverzeichnis**

Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R. D., Boland, C. R., Koi, M., Fishel, R., Howell, S. B. (1996). Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res.* **56**, 3087-3090.

Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., Wijnholds, J., Schinkel, A. H. (1999). The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* **59**, 4237-4241.

Arts, H. J. G., Katsaros, D., de Vries, E. G. E., Massobrio, M., Genta, F., Danese, S., Arisio, R., Scheper, R. J., Kool, M., Scheffer, G. L., Willemse, P. H. B., van der Zee, A. G. J., Suurmeijer, A. J. H. (1999). Drug resistance-associated markers P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein 1, multidrug resistance-associated protein 2, and lung resistance protein as prognostic factors in ovarian carcinoma. *Clin. Cancer. Res.* **5**, 2798-2805.

Ban, N., Takahashi, Y., Takayama, T., Kura, T., Katahira, T., Sakamaki, S., Niitsu, Y. (1996). Transfection of glutathione S-transferase (GST)- $\pi$  antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, mephalan, and etoposide. *Cancer Res.* **56**, 3577-3582.

Bauer, B. E., Wolfger, H., Kuchler, K. (1999). Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 217-236.

Becker, N., Wahrendorf, J. (1998). Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990, 3. völlig neu bearbeitete Auflage, DKFZ Heidelberg.

Bergman, A. M., Giaccone, G., van Moorsel, C. J. A., Mauritz, R., Noordhuis, P., Pinedo, H. M., Peters, G. J. (2000). Cross-resistance in the 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine)-resistant human ovarian cancer cell line AG6000 to standard and investigational drugs. *Eur. J. Cancer* **36**, 1974-1983.

Bertrand, E., Pictet, R., Grange, T. (1994). Can hammerhead ribozymes be efficient tools to inactivate gene function? *Nucleic Acids Res.* **22**, 293-300.

Bettinger, T., Read, M. L. (2001). Recent developments in RNA-based strategies for cancer gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**, 116-124.

Broeks, A., Gerrard, B., Allikmets, R., Dean, M., Plasterk, R. H. A. (1996). Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **15**, 6132-6143.

Brown, R., Hirst, G. L., Gallagher, W. M., McIlwrath, A. J., Margison, G. P., van der Zee, A. G. J., Anthony, D. A. (1997). hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene* **15**, 45-52.

- Büchler, M., König, J., Brom, M., Kartenbeck, J., Spring, H., Horie, T., Keppler, D. (1996). cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMRP, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J. Biol. Chem.* **271**, 15091-15098.
- Camplejohn, R. S., Rutherford, J. (2001). P53 functional assays: detecting p53 mutations in both the germline and in sporadic tumours. *Cell Prolif.* **34**, 1-14.
- Chen, Z., Mutoh, M., Sumizawa, T., Furukawa, T., Haraguchi, M., Tani, A., Saijo, N., Kondo, T., Akiyama, S. (1998). An active efflux system for heavy metals in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **240**, 312-320.
- Chen, Z., Kawabe, T., Ono, M., Aoki, S., Sumizawa, T., Furukawa, T., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M., Akiyama, S. (1999). Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol. Pharmacol.* **56**, 1219-1228.
- Chugani, D. C., Rome, L. H., Kedersha, N. L. (1993). Evidence that vault ribonucleoprotein particles localize to the nuclear pore complex. *J. Cell Sci.* **106**, 23-9.
- Codegoni, A. M., Broggini, M., Pitelli, M. R., Pantarotto, M., Torri, V., Mangioni, C., D'Incalici, M. (1997). Expression of genes of potential importance in the response to chemotherapy and DNA repair in patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **65**, 130-137.
- Cole, S. P. C., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H. et al. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650-1654.
- Cole, S. P. C., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M., Deeley, R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* **53**, 5225-5232.
- Crul, M., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., Maliepaard, M. (1997). Cisplatin resistance and DNA repair. *Cancer Treatment Rev.* **23**, 341-366.
- Cui, Y., König, J., Buchholz, U., Spring, H., Leier, I., Keppler, D. (1999). Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the atypical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* **55**, 929-937.
- Dahm, S. C., Uhlenbeck, O. C. (1991). Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA. *Biochemistry* **30**, 9464-9469.
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42**, 1007-1017.
- Debatin, K. (2000). Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol. Letters* **112-113**, 41-48.
- Dijkstra, M., Havinga, R., Vonk, R. J., Kuipers, F. (1996). Bile secretion of cadmium, silver, zink, and copper in the rat. involvement of various transport systems. *Life Sci.* **59**, 1237-1246.

- Di Marco, A., Gaetani, M., Dorigotti, L. et al. (1963). Studi sperimentali sull'attività antineoplastica del nuovo antibiotico daunomycina. *Tumori* **49**, 203-217
- Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15665-15667.
- Drummond, J. T., Anthoney, A., Brown, R., Modrich, P. (1996). Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL $\alpha$  and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J. Biol. Chem.* **271**, 19645-19448.
- Dubost, M., Ganter, P., Maral, R. et al. (1963). Un nouvel antibiotique à propriétés cytostatiques: la rubidomycine. *C. R. Academie des Sciences (Paris)* **257**, 1813-1815.
- Dunton, C. J. (1997). New options for the treatment of advanced ovarian cancer. *Semin. Oncol.* **24**, S5.2-S5.11.
- Efferth, T. (2001). The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr. Mol. Med.* **1**, 45-65.
- Eva, A., Robbins, K. C., Andersen, P. R., Srinivasan, A., Tronick, S. R., Reddy, E. P., Ellmore, N. W., Galen, A. T., Lautenberger, J. T., Papas, T. S., Westin, E. H., Wong-Staal, F., Gallo, R. C., Aaronson, S. T. (1982). Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells. *Nature* **295**, 116-119
- Fink, D., Nebel, S., Norris, P. S., Baergen, R. N., Wilczynski, S. P., Costa, M. J., Haas, M., Cannistra, S. A., Howell, S. B. (1998). Enrichment for DNA mismatch repair-deficient cells during treatment with cisplatin. *Int. J. Cancer* **77**, 741-746.
- Fogh, J., Bean, M. A., Brügger, J., Fogh, H., Fogh, J. M., Hammar, S. P., Kodera, Y., Loveless, J. D., Sorg, C., Wright, W. C. (1978). Comparison of a human tumor cell line before and after growth in the nude mouse. In: Fogh, J., Giovanella, B., editors. *The Nude mouse in experimental and clinical research*. Academic Press, New York: 215-234.
- Forster, A. C., Symons, R. H. (1987). Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* **50**, 9-16.
- Funato, T., Ishii, T., Kanabe, M., Scanlon, K. J., Sasaki, T. (1997). Reversal of cisplatin resistance in vivo by an anti-fos ribozyme. *in vivo* **11**, 217-220.
- Funato, T., Ishii, T., Kambe, M., Scanlon, K. J., Sasaki, T. (2000). Anti-K-ras ribozyme induces growth inhibition and increased chemosensitivity in human cancer cells. *Cancer Gene Ther.* **7**, 496-500.
- Giaccone, G. (2000). Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* **59**, Suppl. 4, 9-17.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., Perez, J. M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.* **59**, 657-663.
- Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**, 615-627.



Grant, C. E., Valdimarsson, G., Hipfner, D. R. et al. (1994). Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res.* **54**, 357-361.

Hande, K. R. (1998). Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**, 173-184.

Harris, M. J., Kuwano, M., Webb, M., Board, P. G. (2001). Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/cMOAT). *J. Biol. Chem.* **276**, 20876-20881.

Harvard Report on Cancer Prevention (1996). Vol. 1: Causes of human cancer. *Cancer Causes Control Suppl.* **1**, S55-S58

Haselhoff, J., Gerlach, W. L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* **334**, 585-591.

Hawn, M. T., Umar, A., Carethers, J. M., Marra, G., Kunkel, T. A., Boland, C. R., Koi, M. (1995). Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* **55**, 3721-3725.

Heidenreich, O., Eckstein, F. (1992). Hammerhead ribozyme-mediated cleavage of the long terminal repeat RNA of human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* **267**, 1904-1909.

Heidenreich, O., Benseler, F., Fahrenholz, A., Eckstein, F. (1994). High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphothioates. *J. Biol. Chem.* **269**, 2131-2138.

Heim, M. E., Fritze, D., Ho, A. D. et al. (1987). Phase-III-Studie zur Chemotherapie niedrig-maligner Non-Hodgkin-Lymphome: Vergleich einer Vincristin- mit einer Vindesin-Kombinations-Chemotherapie. *Onkologie* **10**, 345-348.

Helmbach, H., Kern, M. A., Rossman, E., Renz, K., Kissel, C., Gschwedt, B., Schadendorf, D. (2002). Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 923-932.

Hendry, P., McCall, M. J., Santiago, F. S., Jennings, P. A. (1995). In vitro activity of minimised hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3922-3927.

Hendry, P., McCall, M. J. (1995). A comparison of the in vitro activity of DNA-armed and all-RNA hammerhead ribozymes. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3928-3936.

Hendry, O., McCall, M. J., Lockett, T. J. (1997). Characterizing ribozyme cleavage reactions. *Methods Mol. Biol.* **74**, 221-229.

Hertel, K. J., Pardi, A., Uhlenbeck, O. C., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W. L., Hodgson, R., Symons, R. H. (1992). Numbering system for the hammerhead. *Nucl. Acids Res.* **20**, 3252.

- Hertel, K. J., Herschlag, D., Uhlenbeck, O. C. (1994). A kinetic and thermodynamic framework for the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* **33**, 2131-2138.
- Holm, P. S., Scanlon, K. J., Dietel, M. (1994). Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell line (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme. *Br. J. Cancer* **70**, 239-243.
- Holm, P. S., Dietel, M., Krupp, G. (1995). Similar cleavage efficiencies of an oligoribonucleotide substrate and an *mdr1* mRNA segment by a hammerhead ribozyme. *Gene* **167**, 221.
- Hooijberg, J. H., Broxterman, H. J., Kool, M., Assaraf, Y. G., Peters, G. J., Noordhuis, P., Scheper, R. J., Borst, P., Pinedo, H. M., Jansen, G. (1999). Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res.* **59**, 2532-2535.
- Iida, T., Kijima, H., Urata, Y., Goto, S., Ihara, Y., Oka, M., Kohno, S., Scanlon, K. J., Kondo, T. (2001). Hammerhead ribozyme against  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase sensitizes human colonic cancer cells to cisplatin by down-regulating both the glutathione synthesis and the expression of multidrug resistance proteins. *Cancer Gene Therapy* **8**, 803-814.
- Ishikawa, T., Ali-Osman, F. (1993). Glutathion-associated cis-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 20116-20125.
- Ishikawa, T., Li, Z., Lu, Y., Rea, P. A. (1997). The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression. *Biosci. Rep.* **17**, 189-207.
- Ito, K., Suzuki, H., Hirohashi, T., Kume, K., Shimizu, T., Sugiyama, Y. (1997). Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am. J. Physiol.* **272**, G16-G22.
- Itoda, M., Saito, Y., Soyama, A., Saeki, M., Murayama, N., Ishida, S., Sai, K., Nagano, M., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Ozawa, S., Sawada, J. J. (2002). Polymorphisms in the ABCC2 (cMOAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals: an association between single nucleotide polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 363-364.
- Izquierdo, M. A., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Schroeijer, A. B., van der Valk, P., Scheper, R. J. (1996). Major vault protein LRP-related multidrug resistance. *Eur. J. Cancer* **32A**, 979-984.
- Jones, N. A., Turner, J., McIlwrath, A. J., Brown, R., Dive, C. (1998). Cisplatin- and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between Bax and Bak up-regulation and the functional status of p53. *Mol. Pharmacol.* **53**, 819-826.
- Jordan, P., Carmo-Fonseca, M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1229-1235.
- Juliano, R. L., Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta* **455**, 152-162.

Kala, S. V., Neely, M. W., Kala, G., Prater, C. I., Atwood, D. W., Rice, J. S., Lieberman, M. W. (2000). The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J. Biol. Chem.* **275**, 33404-33408.

Kamisako, T., Kobayashi, Y., Takeuchi, K., Ishihara, T., Higuchi, K., Tanaka, Y., Gabazza, E. C., Adachi, Y. (2000). Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *J. Gastroenterol.* **35**, 659-664.

Kaufmann, S. H., Earnshaw. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* **256**, 42-49.

Kawabe, T., Chen, Z., Wada, M., Uchiumi, T., Ono, M., Akiyama, S., Kuwano, M. (1999). Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Letters* **456**, 327-331.

Kellner, U., Hutchinson, L., Seidel, A., Lage, H., Danks, M. K., Dietel, M., Kaufmann, S. H. (1997). Decreased drug accumulation in a mitoxantrone-resistant gastric carcinoma cell line in the absence of P-glycoprotein. *Int. J. Cancer* **71**, 817-824.

Keppler, D., König, J. (1997). Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J.* **11**, 509-516.

Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G. (1997). Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol. Chem.* **378**, 787-791.

Keppler, D. (1999). Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Rad. Biol. Med.* **27**, 985-991.

Keppler, D., Cui, Y., König, J., Leier, L., Nies, A. (1999). Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes. *Advan. Enzyme Regul.* **39**, 237-246.

Kern, M. A., Helmbach, H., Artuc, M., Karmann, D., Jurgovsky, K., Schadendorf, D. (1997). Human melanoma cell lines selected in vitro displaying various levels of drug resistance against cisplatin, fotemustine, vindesine or etoposid: modulation of proto-oncogene expression. *Anticancer Res.* **17**, 4359-4370.

Kigawa, J., Minagawa, Y., Kanamori, Y., Itamochi, H., Cheng, X., Okada, M., Oishi, T., Terakawa, N. (1998). Glutathione concentration may be a useful predictor of response to second-line chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Cancer* **82**, 697-702.

Kitazono, M., Sumizawa, T., Takebayashi, Y., Chen, Z., Furukawa, T., Nagayama, S., Tani, A., Takao, Sonshin, Aikou, T., Akiyama, S. (1999). Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 1647-1653.

Kobayashi, H., Kim, N., Halatsch, M. E., Ohnuma, T. (1994). Specificity of ribozyme designed for mutated DHFR mRNA. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1607-1613.

- Koike, K., Kawabe, T., Tanaka, T., Toh, S., Uchiumi, T., Wada, M., Akiyama, S., Ono, M., Kuwano, M. (1997). A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res.* **57**, 5475-5479.
- Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., van Eijk, M. J. T., Juijn, J. A., Baas, F., Borst, P. (1997). Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* **57**, 3537-3547.
- Kowalski, P., Wichert, A., Holm, P. S., Dietel, M., Lage, H. (2001). Selection and characterization of a high-activity ribozyme directed against the antineoplastic drug resistance-associated ABC transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther.* **8**, 185-192.
- Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G. L., Lage, H. (2002). Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC-transporter BCRP/MXR/ABCG2. *Cancer Gene Ther.* **9**: 579-586.
- König, J., Nies, A. T., Cui, Y., Leier, I., Keppler, D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 377-394.
- Kurokawa, H., Ishida, T., Nishio, K., Arioka, H., Sata, M., Fukumoto, H., Miura, M., Saijo, N. (1995). gamma-glutamylcysteine synthetase gene overexpression results in increased activity of the ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump and cisplatin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 258-264.
- Lage, H., Christmann, M., Kern, M. A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B., Schadendorf, D. (1999). Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int. J. Cancer* **80**, 744-750.
- Lage, H., Dietel, M. (1999). Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **125**, 156-165.
- Lage, H. (1999). Atypische Multidrug-Resistenz. *Arzneimitteltherapie* **17**, 39-44.
- Lage, H., Perlitz, C., Abele, R., Tampe, R., Dietel, M., Schadendorf, D., Sinha, P. (2001). Enhanced expression of human ABC-transporter tap is associated with cellular resistance to mitoxantrone. *FEBS Letters* **503**, 179-184.
- Lage, H., Helmbach, H., Grottke, C., Dietel, M., Schadendorf, D. (2001b). DFNA5 (ICERE-1) contributes to acquired etoposide resistance in melanoma cells. *FEBS Letters* **494**, 54-59.
- Lee, N. S., Bertrand, E., Rosel, J. J. (1997). Enhancement of ribozyme function by RNA binding protein. *Ribozyme Protocols, Methods in molecular biology* 74, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Levesque, M. A., Kataros, D., Yu, H. et al. (1995). Mutant p53 protein overexpression is associated with poor outcome in patients with well or moderately differentiated ovarian carcinoma. *Cancer* **75**, 1327-1338.

Lewin, A. S., Hauswirth, W. W. (2001). Ribozyme gene therapy: application for molecular medicine. *Trends Mol. Med.* **7**, 221-228.

Lieber, A., Strauss, M. (1995). Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 540-551.

Lincke, C. R., van der Blick, A. M., Schuurhuis, G. J., van der Velde-Koerts, T. Smit, J. J., Borst, P. (1990). Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human *mdr1* complementary DNA. *Cancer Res.* **50**, 1779-1785.

Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D., Bates, S. E. (2001). From MDR to MXR: new understandings of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 931-959.

Liu, J., Chen, H., Miller, D. S., Saavedra, J. E., Keefer, L. K., Johnson, D. R., Klaassen, C. D., Waalkes, M. P. (2001). Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol. Pharmacol.* **60**, 302-309.

Lu, X., Errington, J., Curtin, N. J., Lunec, J., Newell, D. R. (2001). The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. *Clin. Cancer Res.* **7**, 2114-2123.

Lyngstadaas, S. P. (2001). Synthetic hammerhead ribozymes as tools in gene expression. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **12**, 469-478.

Manetta, A., Blessing, J. A., Hurteau, J. A. (1998). Evaluation of cisplatin and cyclosporin A in recurrent platinum-resistant ovarian cancer: a phase II study of the gynecologic oncology group. *Gynecol. Oncol.* **68**, 45-46

Materna, V., Holm, P. S., Dietel, M., Lage, H. (2001). Kinetic characterization of ribozymes directed against the cisplatin resistance-associated ABC transporter cMOAT/MRP2/ABCC2. *Cancer Gene Ther.* **8**, 1-9.

Minemura, M., Tanimura, H., Tabor, E. (1999). Overexpression of multidrug resistance genes MDR1 and cMOAT in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cell lines. *Int. J. Oncol.* **15**, 559-563.

Mor-Cohen, R., Zivelin, A., Rosenberg, N., Shani, M., Muallem, S., Seligsohn, U. (2001). Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome. *J. Biol. Chem.* **276**, 36923-36930.

Nagata, J., Kijima, H., Hatanaka, H., Asai, S., Miyachi, H., Takagi, A., Miwa, T., Mine, T., Yamazaki, H., Nakamura, M., Kondo, T., Scanlon, K. J., Ueyama, Y. (2001). Reversal of cisplatin and multidrug resistance by ribozyme-mediated glutathione suppression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 406-413.

Narasaki, F., Oka, M., Nakano, R., Ikeda, K., Fukuda, M., Nakamura, T., Soda, H., Nakagawa, M., Kuwano, M., Kohno, S. (1997). Human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) is expressed in human lung, gastric, and colorectal cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 606-611.

Nies, A. T., König, J., Pfannschmidt, M., Klar, E., Hofmann, W. J., Keppler, D. (2001). Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **94**, 492-499.

Oguri, T., Fujiwara, Y., Isobe, T., Katoh, O., Watanabe, H., Yamakido, M. (1998). Expression of gamma-glutamylcysteine synthetase (gamma-GCS) and multidrug resistance-associated protein (MRP), but not human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT), genes correlates with exposure of human lung cancers to platinum drugs. *Br. J. Cancer* **77**, 1089-1096.

Oguri, T., Fujiwara, Y., Miyazaki, M., Takahashi, T., Kurata, T., Yokozaki, M., Ohashi, N., Isobe, T., Katoh, O., Yamakido, M. (1999). Induction of gamma-glutamylcysteine synthase gene expression by platinum drugs in peripheral mononuclear cells of lung cancer patients. *Ann. Oncol.* **10**, 455-460.

Ozols, R. F., Young, R. C. (1991). Chemotherapy of ovarian cancer. *Semin. Oncol.* **18**, 222

Parekh, H., Simpkins, H. (1996). Cross-resistance and collateral sensitivity to natural product drugs in cisplatin-sensitive and -resistant rat lymphoma and human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **37**, 457-462.

Parker, S. L., Tong, T., Bolden, S., Wingo, P. A. (1997). Cancer statistics 1997. *CA Cancer J. Clin.* **47**, 5-27.

Paulusma, C. C., Bosma, P. J., Zaman, G. J. R., Bakker, C. T. M., Otter, M., Scheffer, G. L., Scheper, R. J., Borst, P., Oude-Elferink, R. P. J. (1996). Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **271**, 1126-1128.

Perego, P., Giarola, M., Righetti, S. C., Supino, R., Caserini, C., Delia, D., Pierotti, M. A., Miyashita, T., Reed, J. C., Zunino, F. (1996). Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res.* **56**, 556-562.

Perez, R. P., Godwin, A. K., Handel, L. M., Hamilton, T. C. (1993). A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for determination of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. *Eur. J. Cancer* **29A**, 395-399.

Pratt, W. B., Ruddon, R. W., Ensminger, W. D., Maybaum, J. (1994). The Anticancer Drugs. 2nd edition, Oxford University Press, New York, Oxford.

Pieken, W. A., Olsen, D. B., Benseler, F., Aurup, H., Eckstein, F. (1991). Structure-function relationship of hammerhead ribozymes as probes by 2'-modifications. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **24**, 51-53.

Righetti, S. C., Della Torre, G., Piloti, S., Menard, S., Ottone, F., Colnaghi, M. I., Pierotti, M. A., Lavarino, C., Cornarotti, M., Oriana, S., Bohm, S., Bresciani, G. L., Spatti, F., Zunino F. (1996). A comparative study of p53 mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 689-693.

- Rocchi, E., Khodjakov, A., Volk, E. L., Yang, C., Litman, T., Bates, S. E., Schneider, E. (2000). The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**, 42-46.
- Rodriguez-Galindo, C., Radomski, K., Stewart, C. F., Furman, W., Santana, V. M., Houghton, P. J. (2000). Clinical use of topoisomerase I inhibitors in anticancer treatment. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**, 385-402.
- Rose, P. G., Blessing, J. A., Mayer, A. R., Homesley, H. D. (1998). Prolonged oral etoposide as second-line therapy for platinum-resistant and platinum-sensitive ovarian carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J. Clin. Oncol.* **16**, 405-410.
- Rosenberg, B., van Camp, L., Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698-699.
- Ross, W., Rowe, T., Glisson, B. et al. (1984). Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage. *Cancer Res.* **44**: 5857-5860.
- Ross, D. D., Yang, W., Abruzzo, L. V., Dalton, W. S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S. P. C., Doyle, L. A. (1999). Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**, 429-433.
- Roy, G., Horton, J. K., Roy, R., Denning, T., Mitra, S., Boldogh, I. (2000). Acquired alkylating drug resistance of a human ovarian carcinoma cell line is unaffected by altered levels of pro- and anti-apoptotic proteins. *Oncogene* **19**, 141-150.
- Sambrook, J., Russell, D. W (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. Vol. 1-3, 3rd edition, Cold Spring Harbor Lab press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sen, D., Geyer, C. R. (1998). DNA enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 680-687.
- Senchenkov, A., Litvak, D., A., Cabot, M. C. (2001). Targeting ceramid metabolism - a strategy for overcoming drug resistance. *J. Natl. Cancer. Inst.* **93**, 347-357.
- Sharp, S. Y., Smith, V., Hobbs, S., Kelland, L. R. (1998). Lack of a role for MRP1 in platinum drug resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **78**, 175-180.
- Siddik, Z. H., Mims, B., Lozano, G., Thai, G. (1998). Independent pathway of p53 induction by cisplatin and X-rays in a cisplatin-resistant ovarian tumor cell line. *Cancer Res.* **58**, 698-703.
- Soini, Y., Järvinen, K., Kaarteenaho-Wiik, R., Kinnula, V. (2001). The expression of P-glycoprotein and multidrug resistance proteins 1 and 2 (MRP1 and MRP2) in human malignant mesothelioma. *Ann. Oncol.* **12**, 1239-1245.
- Stein, C. A., Cheng, Y. (1993). Antisense oligonucleotides as therapeutic agents - is the bullet really magical? *Science* **261**, 1004-1011.

Stöckel, B., König, J., Nies, A. T., Cui, Y., Brom, M., Keppler, D. (2000). Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1347-1358.

Strange, R. C., Jones, P. W., Fryer, A. A. (2000). Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* **112-113**, 357-363.

Sugawara, N., Lai, Y., Arizono, K., Kitajima, T., Inoue, H. (1997). Lack of biliary excretion of Cd linked to an inherent defect of the canalicular isoform of multidrug resistance protein (cMrp) does not abnormally stimulate accumulation of Cd in the Eisai hyperbilirubinemic (EHB) rat liver. *Arch. Toxicol.* **71**, 336-339.

Sugawara, N., Lai, Y., Sugawara, C., Arizono, K. (1998). Decreased hepatobiliary secretion of inorganic mercury, its deposition and toxicity in the Eisai hyperbilirubinemic rat with no hepatic canalicular organic anion transporter. *Toxicology* **126**, 23-31.

Tanaka, T., Uchiumi, T., Hinoshita, E., Inokuchi, A., Toh, S., Wada, M., Takano, H., Kohno, K., Kuwano, M. (1999). The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* **30**, 1507-1512.

Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., Kagotani, K., Okumura, K., Akiyama, S., Kuwano, M. (1996). A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* **56**, 4124-4129.

Theodoulou, F. L. (2000). Plant ABC transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 79-103.

Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochem.* **27**, 502-522.

Toh, S., Wada, M., Uchiumi, T., Inokuchi, A., Makino, Y., Horie, Y., Adachi, Y., Sakisaka, S., Kuwano, M. (1999). Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 739-746.

Trimmer, E. E., Essigmann, J. M. (1999). Cisplatin. *Essays Biochem.* **34**, 191-211.

Tsujii, H., König, J., Rost, D., Stöckel, B., Leuschner, U., Keppler, D. (1999). Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterol.* **117**, 653-660.

van der Zee, A. G., Hollema, H., Suurmeijer, A. J. et al. (1995). Value of P-glycoprotein, glutathion S-transferase pi, c-erbB-2, and p53 as prognostic factors in ovarian carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **13**, 70-78.

Wichert, A., Holm, P. S., Dietel, M., Lage, H. (1999). Selection of a high activity ribozyme against cytostatic drug resistance-associated glypican-3 using an in vitro assay containing total tumor RNA. *Cancer Gene Ther.* **6**, 263-270.



---

Willet, W. C. (1995) Diet, nutrition and avoidable cancer. *Environmental Health Perspectives* **103** (Suppl. 8), S165-S170.

Williams, S. D., Birch, R., Einhorn, L. H. et al. (1987). Dissiminated germ cell tumor: chemotherapy with cisplatin plus bleomycin plus either vinblastine or etoposid. A trial of the Southeastern Cancer Study Group. *N. Engl. J. Med.* **316**, 1435-1440.

Yao, K., Godwin, A. K., Johnson, S. W., Ozols, R. F., O'Dwyer, P. J., Hamilton, T. C. (1995). Evidence for altered regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression among cislatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* **55**, 4367-4374.

Young, L. C., Campling, B. G., Voskoglou-Nomikos, T., Cole, S. P. C., Deeley, R. G., Gerlach, J. H. (1999). Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin. Cancer Res.* **5**, 673-680

Young, J., Holland, I. B. (1999). ABC transporters: bacterial exporters – revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 177-200.

Zanetta, G., Monico, S. L., Gabriele, A., Miceli, D., Mangioni, C. (1996). Chemotherapy with doxorubicin, etoposide and cyclophosphamide (DEC) in ovarian cancer persistent after platinum-based treatment. *Eur. J. Cancer* **32A**, 178-179.

Zarrinkar, P. P., Williamson, J. R. (1994). Kinetic intermediates in RNA folding. *Science* **265** (5174), 918-924.

Zeller und zur Hausen (1995). Onkologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen. Loseblattsammlung.

Zimniak, P. (1993). Dubin-Johnson and Rotor syndromes: molecular basis and pathogenesis. *Semin. Liver. Dis.* **13**, 248-260.

Zuker, M., Stiegler, P. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**, 133-148.

---

**Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pathologie der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, angefertigt. Herrn PD Dr. Lage danke ich für die Überlassung dieses interessanten und praxisrelevanten Themas, sowie für seine Betreuung während der gesamten Bearbeitungszeit. Seine unermüdlichen Bemühungen um die Finanzierung des Projektes halfen, diese Arbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen. Ich erhielt ebenfalls die Möglichkeit, einen Teil meiner Experimente am *Research Institute for Biological Sciences* (Chiba, Japan) bei Prof. Hozumi durchzuführen. Mein Dank gilt daher auch meinen japanischen Kollegen und Freunden, die mich während meines Aufenthaltes sowohl im Labor als auch im Alltag sehr unterstützt haben.

---

**Curriculum vitae**Persönliche Daten

Name	Verena Waltraut Materna, geb. Schaub
geboren am	07.10.1973
in	Bautzen
Familienstand	verheiratet seit 14.08.1998

Schulbildung

1980-1990	Polytechnische Oberschule in Cottbus, Abschluß: Mittlere Reife
-----------	--

1990-1992	Gymnasium in Cottbus, Abschluß: Abitur
-----------	--

Beruflicher Werdegang

1992-1997	Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin; Abschluß: Diplom
-----------	---

1996-1997	Diplomarbeit am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin über das Thema: „Peptidsynthetasegene in nichttoxischen Stämmen von <i>Microcystis aeruginosa</i> “
-----------	---

seit 1997	Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Institut für Pathologie der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin
-----------	--

März/April 2001	Forschungsarbeiten am Reseach Institute for Biological Sciences; Science University of Tokyo, Japan
-----------------	---

---

## Publikationsliste

### Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Neilan, B. A., Dittmann, E., Rouhiainen, L., Bass, A., Schaub, V., Sivonen, K., Börner, T. (1999). Nonribosomal Peptide Synthesis and Toxicity of Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* **181**, 4089-4097.

Materna, V., Holm, P. S., Dietel, M., Lage, H. (2001). Kinetic characterization of ribozymes directed against the cisplatin resistance-associated ABC transporter cMOAT/MRP2/ABCC2. *Cancer Gene Therapy* **8**, 176-184.

### Vorträge

Eingeladener Vortrag am 13.04.2001:

Research Institute for Biological Sciences, Science University of Tokyo (Japan) zum Thema: "Examinations on cMOAT-dependent cisplatin resistance in human tumour cell lines"

### Poster

Schaub, V., Hoffmann, U., Blohmer, J. U., Grottke, C., Mantwill, K., Wichert, A., Dietel, M., Lage, H. (1997). Quantitative Expression Analysis of Genes Involved in Development of Chemoresistance in Ovarian Carcinoma *in vitro* and *in vivo*. 4<sup>th</sup> International Symposium on Cytostatic Drug Resistance, Berlin. Band of Abstracts, 96.

Grottke, C., Mantwill, K., Schaub, V., Wichert, A., Dietel, M., Lage, H., Schadendorf, D. (1997). Searching for Novel Drug Resistance Associated Genes in Human Melanoma Cells by Differential Display RT-PCR. 4<sup>th</sup> International Symposium on Cytostatic Drug Resistance, Berlin. Band of Abstracts, 58.

Mantwill, K., Grottke, C., Schaub, V., Wichert, A., Dietel, M., Lage, H. (1997). Search for Genes Playing a Role in Atypical Multidrug Resistance in Gastrointestinal Tumours by a Differential Display Technique (DDRT-PCR). 4<sup>th</sup> International Symposium on Cytostatic Drug Resistance, Berlin. Band of Abstracts, 78

Wichert, A., Kirch, B., Holm, P. S., Grottke, C., Mantwill, K., Schaub, V., Dietel, M., Lage, H. (1997). Towards Reversion of Atypical Multidrug Resistance: Development of Two Hammerhead Ribozymes Against the Resistance Associated MXR7/GPC3-Gene. 4<sup>th</sup> International Symposium on Cytostatic Drug Resistance, Berlin. Band of Abstracts, 113.

Grottke, C., Kern, M., Mantwill, K., Schaub, V., Wichert, A., Dietel, M., Lage, H., Schadendorf, D. (1998). Novel Potential Drug Resistance Associated Genes in Human Melanoma Cells. *J. Mol. Med.* **76**, B13, P-44.

Mantwill, K., Grottke, C., Schaub, V., Wichert, A., Dietel, M., Lage, H. (1998). Detection of Genes Related to Apical Multidrug Resistance in Gastrointestinal Tumours by Differential Display Technique (DDRT-PCR). *J. Mol. Med.* **76**, B16, P-54

---

Wichert, A., Grottke, C., Holm, P. S., Mantwill, K., Perlitz, C., Schaub, V., Dietel, M., Lage, H. (1998). Efficient Selection of a High Activity Ribozyme Against the Cytostatic Drug Resistance Associated MXR7 mRNA. *J. Mol. Med.* **76**, B22, P-78

Schaub, V., Hoffmann, U., Blohmer, J. U., Dietel, M., Lage, H. (1998). Different Methods for Quantitative Expression Analysis of Genes Involved in Chemoresistance in Ovarian Carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **124** (Suppl.), R130, P2.15.02.

Hoffmann, U., Materna, V., Blohmer, J.-U., Sehouly, J., Lichtenegger, W., Dietel, M., Lage, H. (2000). Quantitative expression analysis of genes involved in the development of chemoresistance in ovarian carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* **196**, 235.

---

**Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Berlin, den 14. August 2002

Verena Materna